Merulinsäure A, B und C und Merulidial, neue Antibiotika aus Basidiomyceten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WOLFRAM QUACK

aus Mönchengladbach (Odenkirchen)

1978

78 190

Merulinsäure A, B und C und Merulidial, neue Antibiotika aus Basidiomyceten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WOLFRAM QUACK

aus Mönchengladbach (Odenkirchen)

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	21. März 1978
Dekan:	Prof. Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Oberwinkler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zähner

Druck: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Oberwinkler und unter Anleitung von Herrn Dr. T. Anke am Institut für Biologie I, Lehrbereich Spezielle Botanik, der Universität Tübingen angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Oberwinkler.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Anke für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge und sein ständiges Interesse an meiner Arbeit.

Für die Strukturermittlung der Merulinsäuren und des Merulidials und die Herstellung einiger Derivate dieser Antibiotika, sowie für die Erlaubnis, diese Ergebnisse in meiner Arbeit verwerten zu dürfen, möchte ich Herrn B.M. Giannetti und Herrn Prof. Dr. W. Steglich, Institut für Organische Chemie der Universität Bonn, herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. H. Zähner und Herrn Dr. H. Wolf, Lehrbereich Mikrobiologie I der Universität Tübingen, gilt mein Dank für die Überlassung zahlreicher Testorganismen.

Allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Spezielle Botanik danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die im Serviceprojekt Z des Sonderforschungsbereiches 76 der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführte Fermentation im 100l-Fermenter danke ich den Herren Neubauer und Sauerbier.

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
cpm	counts per minute
E_{650}	Extinktion bei 650 nm in einer Zelle mit der Dicke 1 cm
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule, Institut für Spezielle Botanik, Zürich, Schweiz
Herb. FO	Herbarium F. Oberwinkler
Herb. LH	Herbarium L. Horovitz
Herb. PB	Herbarium P. Blanz
Herb. RA	Herbarium R. Agerer
Herb. WQ	Herbarium W. Quack
his^-	Histidin-auxotroph
his^+	Histidin-prototroph
I.E.	Internationale Einheiten
IR	Infrarot
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NCTC	National Collection of Type Cultures, London, Großbritanien
rpm	rounds per minute
TMP	Thymidinmonophosphat
TDP	Thymidindiphosphat
TTP	Thymidintriphosphat
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I
UV	Ultraviolett
Ve/Vt	Elutionsvolumen/Totalvolumen

Inhaltsverzeichnis Seite

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 5

1. Chemikalien 5
2. Nährmedien 6
3. Versuchsstämme 9
4. Teststämme 13
4.1. Bakterien 13
4.2. Pilze 13
5. Kultivierung der Versuchsstämme 15
5.1. Aufbewahrung der Stämme 15
5.2. Submerskultur 15
5.2.1. Submerskultur in Schüttelkolben 15
5.2.2. Submerskultur in Fermentern 15
6. Plattendiffusionstest 16
6.1. Testplatten mit Bakterien 16
6.2. Testplatten mit Pilzen 16
7. Bestimmung des Wachstums von Pythium debaryanum 16
8. Verdünnungsreihentest 16
9. Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A, B und C 17
10. Isolierung und Reinigung von Merulidial aus Merulius tremellosus Fr. 18
11. Dünnschichtchromatographie 19
12. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil und Leucin in vegetative Zellen von Bacillus brevis 19
13. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uridin und Leucin in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms der Maus 20
14. Test auf hämolytische Aktivität 22
15. Prüfung auf Mutagenität 22
15.1. Herstellung der Testplatten 23
15.2. Nachweis der Mutagenität im Plattendiffusionstest 23

15.3. Nachweis der Mutagenität durch Eingießen des Antibiotikums 24
16. Versuche mit dem Biophotometer 24
17. Spektren 24

III. Ergebnisse 25

A. Merulinsäure A, B und C 25
1. Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A, B und C aus Fruchtkörpern von Merulius tremellosus Fr. und Phlebia radiata Fr. 25
2. Physikalisch-chemische Eigenschaften 26
2.1. Schmelzpunkte 26
2.2. Löslichkeiten 26
2.3. Chromatographisches Verhalten 26
2.4. UV-Spektren 27
2.5. IR-Spektren 27
2.6. Massenspektren 34
3. Strukturen 36
4. Wirkungsspektren 37
5. Einfluß der Merulinsäuren auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo 38
6. Hämolytische Eigenschaften 40
7. Vergleich der antibiotischen Aktivität der Merulinsäure A mit der ihres Trimethylderivates 41

B. Screening 42

C. Merulidial 42
1. Fermentation 42
2. Isolierung und Reinigung 43
3. Physikalisch-chemische Eigenschaften 43
3.1. Schmelzpunkt 43
3.2. Löslichkeit 43
3.3. Chromatographisches Verhalten
3.4. UV-Spektrum 44
3.5. IR-Spektrum 45

3.6. Massenspektrum 47
4. Struktur 48
5. Wirkungsspektren 48
5.1. Wirkungsspektrum bei Bakterien 48
5.2. Wirkungsspektrum bei Pilzen 50
6. Einfluß auf das Wachstum von Pythium debaryanum 51
7. Biophotometerversuch 53
8. Einfluß des Merulidials auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo 54
8.1. Einfluß des Merulidials auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vegetativen Zellen von Bacillus brevis bei konstanter Inkubationszeit und verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums 54
8.2. Einfluß des Merulidials auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms 54
9. Prüfung auf Mutagenität (Test nach Ames) 57
9.1. Nachweis der Mutagenität im Plattendiffusionstest 57
9.2. Nachweis der Mutagenität durch Eingießen des Antibiotikums in die Testplatten 57
10. Hämolytische Eigenschaften 59
11. Vergleich der antibiotischen Aktivität von Merulidial mit der seines Triol- und Acetylderivates 59

IV. Diskussion 62
A. Merulinsäure A, B und C 62
B. Merulidial 69
C. Chemotaxonomische Aspekte 73

V. Zusammenfassung 75

VI. Literaturverzeichnis 77

I. Einleitung

Die meisten der in den letzten 30 - 40 Jahren entdeckten Antibiotika wurden bei Bakterien gefunden, von denen wiederum Arten der Gattung Streptomyces am häufigsten als Lieferant dieser Stoffe auftraten.

In neuerer Zeit nimmt allerdings die Zahl der aus Bakterien isolierten neuen Antibiotika deutlich ab, da sich häufig zunächst als neu angenommene antibiotisch aktive Substanzen bald als bekannte Stoffe entpuppen, die bereits früher bei anderen Stämmen gefunden wurden. Die Verwendung anderer Screening- und Testmethoden als die bisher üblichen läßt jedoch die berechtigte Hoffnung zu, auch bei Bakterien weitere antibiotisch aktive Substanzen zu finden (Zähner, 1977).

Die Suche nach Antibiotika bei Basidiomyceten hingegen steckt erst in den Anfängen. Zuvor wurden in den Jahren 1944 - 1949 besonders von Robbins et al. (1945) und von Wilkins (1947 a - c; 1948) ca. 2000 Stämme von Basidiomyceten auf antibiotische Aktivität geprüft, jedoch sehr selten die für diese Wirkung verantwortlichen Substanzen isoliert. Eine zusammenfassende Übersicht über die in jenen Jahren untersuchten Pilze wurde von Hervey (1947) und von Florey et al. (1949) aufgestellt.

Erst in den letzten Jahren sind wieder Basidiomyceten in größerem Umfang auf antibiotische Aktivität getestet worden, was sich auch

in der steigenden Zahl der aus dieser Organismenklasse isolierten Antibiotika bemerkbar macht. Von insgesamt 3222 bekannten Antibiotika macht sich die Zahl von 140 antibiotisch aktiven Substanzen aus Basidiomyceten dennoch recht bescheiden aus (Berdy, 1974).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, antibiotisch aktive Substanzen aus Fruchtkörpern und -soweit vorhanden- aus den Submerskulturen der saprophytisch wachsenden Weißfäuleerreger Merulius tremellosus Fr. und Phlebia radiata Fr. (Basidiomycetes) zu isolieren und zu charakterisieren.

Neben der Erstellung von Wirkungsspektren sollten auch die Wirkungsmechanismen dieser Antibiotika untersucht, und wenn möglich, geklärt werden.

Die Typusart der Gattung Merulius Fr., Merulius tremellosus Fr., von Fries noch zu den Polyporaceae gerechnet, von diesen jedoch hauptsächlich durch ein kontinuierliches, gefälteltes, nur manchmal 'porioides' Hymenium unterschieden (Cunningham, 1963), ist nach Eriksson und Ryvarden (1976) als einzige Art ihrer Gattung für den nordeuropäischen Bereich übrig geblieben.
Allerdings sind in den vergangenen Jahrzehnten immer wieder Arten auf Grund einzelner anatomischer Übereinstimmungen oder wegen habitueller Ähnlichkeiten von ihren Gattungen getrennt und zu Merulius gestellt worden. Andererseits wurden aber auch Arten, die lange dem Genus Merulius zugeordnet waren, zu Gattungen, wie zum Beispiel Athelia Pers., Phlebia Fr. oder Plicatura Rea gestellt.

Zu Merulius Fr., wie die oben erwähnten Gattungen zu den Corticiaceae Fr. gehörend (Christiansen, 1960), wurde auch lange die Gattung Serpula S.F. Gray (Coniophoraceae Donk) gerechnet, die von Merulius s. str. vor allem durch braune, dickwandige, mit einem Keimporus versehene cyanophile Sporen getrennt ist. Corner (1971) mißt der Sporenfarbe und der Anfärbbarkeit der Sporen mit Baumwollblau jedoch keine große Bedeutung zu und schlägt daher vor, in die nach Fries weit gefaßte Gattung Merulius auch die im Genus Serpula zusammengefaßten Arten einzubeziehen.

Arten der Gattung Athelia Pers. em. Donk, zu denen nach Eriksson (1958) und Christiansen (1960) Merulius borealis Romell und Merulius molluscus Fr. gehören, weisen in frischem Zustand oft 'Merulius'-artige Fältelungen auf, die nach Eintrocknen der Fruchtkörper jedoch wieder verschwinden (Donk, 1957; Eriksson et Ryvarden, 1976).

Die Gattung Byssomerulius Parm. mit der Typusart Merulius corium Fr. weist ebenfalls ein gefälteltes Hymenium auf, steht auf Grund mikroskopischer Merkmale (Eriksson et Ryvarden, 1976) aber auch Phanerochaete Karst. nahe (Oberwinkler, 1970).

Die Gattung Meruliopsis mit der Typusart Meruliopsis taxicola (Pers.) Bond. (≙ Poria taxicola Bres.) zeigt nach Donk (1964) und Ginns (1976) mit Byssomerulius weitgehende Übereinstimmung.

Leucogyrophana Pouz. zeichnet sich u.a. durch ein weißes - gelbes - orangerotes Hymenium aus und hat hellgelbe - gelbe, ovale und dickwandige cyanophile Sporen (Eriksson et Ryvarden, 1976). Leucogyrophana pseudomollusca (Parm.) Parm. (≙ Merulius pseudomolluscus Parm.), von Harmsen (1954) unter dem Namen Merulius molluscus Fr. zu den weißsporigen Merulius-Arten (Leptospori) gestellt, hat ein stark gefälteltes Hymenium und weist sowohl unter den Fruchtkörpern als auch in Kultur charakteristische Sklerotien auf.

Das Genus Panellus Karst. zeigt einige mikroskopische Merkmale, wie allantoide, kleine Sporen und Medaillonschnallen (Lange et Hansen, 1954), die sich gehäuft nur bei den Aphyllophorales und dort besonders bei Merulius s.l. finden.

Größte Gemeinsamkeiten mit Merulius tremellosus zeigen Arten der Gattung Phlebia Fr. em. Donk. Besonders Phlebia radiata Fr. und Phlebia rufa (Fr.) M.P. Christ. (≙ Merulius rufus Fr.) stimmen sowohl in makroskopischen als auch in mikroskopischen Merkmalen mit Merulius tremellosus überein.

Bei der Gattung Gloeoporus Mont. weisen ein kontinuierliches Hymenium und kleine, allantoide Sporen auf Ähnlichkeiten mit Merulius tremellosus hin (Ginns, 1976).

Plicatura crispa (Fr.) Rea, früher oft als Merulius crispus Fr. bezeichnet, deutet nur durch eine gefältelte - aderige Struktur des Hymeniums auf Übereinstimmungen mit Merulius tremellosus hin.

Auf der Grundlage eines Screenings und der Aufarbeitung verfügbarer Fruchtkörper sollten Arten dieser Gattungen auf die Bildung von antibiotisch aktiven Substanzen untersucht werden, um neue Anhaltspunkte für bislang ungenügend geklärte verwandtschaftliche Beziehungen zu finden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien

Sofern nicht besonders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma E. Merck, Darmstadt verwendet.

Glucose	Deutsche Maizenawerke, Hamburg
Malzextrakt, 'Löfflunds'-	Dr. Fränkle & Max Eck, Fellbach
Bacto Nutrient broth Bacto Yeast Nitrogen Base Bacto Yeast extract Bacto Corn meal agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Niax Polyol LHT 67	Brenntag GmbH, Mülheim/Ruhr
Sephadex LH-20	Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden
Kieselgel MALLINCKRODT -100 mesh	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Heparin-Natrium	
(2-^{14}C)-Thymidin 61 mCi/mM	Radiochemical Centre, Amersham, Großbritanien
(2-^{14}C)-Uridin 53 mCi/mM	
(2-^{14}C)-Uracil 59 mCi/mM	
(1-^{14}C)-L-Leucin 59 mCi/mM	

2. Nährmedien

- Nährlösung 1

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glucose	4,0 g
Leitungswasser	1,0 l

Für die Anzucht der Versuchsstämme (Basidiomycetes) wurde ein pH von 5 eingestellt.

- Nähragar 1

Nährlösung 1 + 15 g Agar

- Nährlösung 2, RAULIN-THOM-Lösung (mod. nach Raistrick et Rudman, 1956)

Thiamin	0,01 mg
Biotin	0,01 mg
Glucose	50,0 g
Diammonium-D-tartrat	3,0 g
L-(+)-Weinsäure	3,0 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,4 g
K_2CO_3	0,4 g
Magnesiumhydroxydcarbonat	0,5 g
$FeSO_4 \times 7H_2O$	50 mg
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	50 mg
entionisiertes Wasser	1,0 l

- Nähragar 2

Nährlösung 2 + 15 g Agar (getrennt autoklaviert)

- Nährlösung 3

Nutrient broth	8,0 g
entionisiertes Wasser	1,0 l

- Nähragar 3

Nährlösung 3 + 10 g Agar

- Nähragar 4

Malzextrakt	20,0 g
Agar	15,0 g
Leitungswasser	1,0 l

- Nähragar 5

Bacto Yeast Nitrogen Base	6,7 g
Glucose	4,0 g
Agar	20,0 g
entionisiertes Wasser	1,0 l

- Nähragar 6

Clostridien-Nährboden Merck 5411 + 2 % Agar
Anaerobiose-Ringe, Merck

- Nähragar 7

Corn meal agar, Difco	1,7 %

- Nähragar 8 (Vogel et Bonner, 1956, mod. nach Ames et al., 1975)

$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2 g
Zitronensäure	2,0 g
K_2HPO_4	10,0 g
$NaNH_4HPO_4 \times 7H_2O$	3,5 g
Glucose	20,0 g
Agar	15,0 g
entionisiertes Wasser	1,0 l

- Nähragar 9 (Ames et al., 1975)

Agar	0,6 %
NaCl	0,5 %
entionisiertes Wasser	40,0 ml

Die Medien wurden 20 Minuten bei 121 °C, die Fermentationsansätze 30 Minuten lang, autoklaviert.

3. Versuchsstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden 31 Stämme (= 26 Arten) auf antibiotisch aktive Substanzen untersucht.
Die folgende Aufstellung gibt diese Versuchsstämme mit ihren Funddaten wieder. Von den mit +) bezeichneten Stämmen wurden auch Fruchtkörper aufgearbeitet und auf das Vorhandensein antibiotisch wirksamer Metabolite untersucht.

Athelia spec. - FO 23013
Deutschland, Baden-Württemberg, Emmendingen, bei Wildenreute-Sexau, 2.9.1975 F. Oberwinkler (Herb. FO 23013)

Athelia spec. - LH 352
Deutschland, Bayern, Oberpfalz, bei Nabburg, 8.9.1975 L. Horovitz (Herb. LH 352)

Athelia epiphylla Pers. - FO 23408
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Steinenberg 9.12.1975 F. Oberwinkler (Herb. FO 23408)

Byssomerulius spec. - FO 22261
Deutschland, Bayern, Hirschberg zwischen Eilching und Mauern, westl. von München, 9.11.1974 F. Oberwinkler (Herb. FO 22261)

Corticium evolvens (Fr. ex Fr.) Fr. - WQ 69
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Heuberger Tor, 27.4.1976 W. Quack (Herb. WQ 69)

Corticium tuberculatum Karst. - RA 6143
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Eisenbachhain 24.6.1975 R. Agerer (Herb. RA 6143)

Gloeoporus amorphus (Fr.) Clem. et Shear. - WQ 42
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Steinenberg, 20.1.1976 W. Quack (Herb. WQ 42)

Leucogyrophana pseudomollusca (Parm.) Parm. - WQ 591
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Geißhalde, 19.10.1976 W. Quack (Herb. WQ 591)

Merulius corium Fr. - FO 22250
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Tellerklinge bei Bebenhausen, 6.11.1974 F. Oberwinkler (Herb. FO 22250)

- WQ 615
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Wald beim Hagellocher Sportplatz, 23.11.1976 W. Quack (Herb. WQ 615)

Merulius tremellosus Fr. - LH 148
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Spitzberg, 22.10.1974 L. Horovitz (Herb. LH 148)

- WQ 500
Deutschland, Baden-Württemberg, Wald bei Herrenberg, 2.9.1976 G. Kost (Herb. WQ 500)

- WQ 568 +)
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Botanischer Garten, Wegbegrenzung (Laubholzstumpf) im Rhododendronhain, 28.9.1976 W. Quack (Herb. WQ 568)

Merulius spec. - WQ 38
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Heuberger Tor, 18.2.1976 Chr. Sautter (Herb.WQ 38)

Merulius spec. - FO 23050
Deutschland, Baden-Württemberg, Schwarzwald, Hinterzartener Moor, 3.9.1975 F. Oberwinkler (Herb. FO 23050)

Panellus serotinus (Pers. ex Fr.) Kühn. - WQ 625 +)
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Eisenbachhain, 14.12.1976 W. Quack (Herb WQ 625)

Peniophora cinerea (Fr.) Cke. - PB 2123
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Heuberger Tor, Bettelbach, 15.1.1975 P. Blanz (Herb. PB 2123)

Peniophora incarnata (Pers. ex Fr.) Karst. - WQ 41
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Heuberger Tor 8.2.1976 W. Quack (Herb. WQ 41)

Peniophora limitata (Chaill. ex Fr.) Cke. - FO 23378
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Hohenentringen 25.11.1975 F. Oberwinkler (Herb.FO 23378)

Peniophora pithya (Pers.) John Erikss. - WQ 40
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Heuberger Tor, 10.2.1976 W. Quack (Herb. WQ 40)

Peniophora violaceo-livida (Sommerf.) Mass. - WQ 71
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Spitzberg, 4.5.1976 W. Quack (Herb. WQ 71)

Phlebia gigantea (Fr. ex Fr.) Donk - WQ 44
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Steinenberg, 26.1.1976 W. Quack (Herb. WQ 44)

Phlebia hydnoides (Cke. et Mass.) Chris. - RA 6092
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Hohenentringen 23.5.1975 R. Agerer/P. Blanz (Herb. RA 6092; Herb. PB 2848a)

Phlebia radiata Fr. - WQ 45
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Himbachtal, 4.11.1975 W. Quack (Herb. WQ 45)

- WQ 516 +)
Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Eisenbachhain 7.9.1976 W. Quack (Herb. WQ 516)

- FO 23341

Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Bogentor, 28.10.1975 F. Oberwinkler (Herb. FO 23341)

Phlebia subserialis (Bourd. et Galz.) Donk - FO 22647

Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Eisenbachhain, 15.4.1975 F. Oberwinkler (Herb. FO 22647)

Phlebia spec. - WQ 614

Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Tübingen, Kirnbachtal, 16.11.1976 F. Oberwinkler (Herb. WQ 614)

Plicatura crispa (Fr.) Rea - WQ 587 +)

Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Schönbuch bei Bebenhausen, 19.10.1976 W. Quack (Herb. WQ 587)

Poria taxicola Bres. - LH 253

Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Rosenau, 25.5.1975 L. Horovitz (Herb. LH 253)

Serpula spec. - FO 22302

Deutschland, Baden-Württemberg, Schönbuch, Eisenbachhain, 9.1.1975 F. Oberwinkler (Herb. FO 22302)

4. Teststämme

4.1. Bakterien

Pseudomonadales

Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525 NL 3 27 °C

Eubacteriales

Aerobacter aerogenes Hormaeche et Edwards NL 3 37 °C
Arthrobacter citreus Sacks - ATCC 11624 NL 3 27 °C
Bacillus brevis Migula - ATCC 9999 NL 3 37 °C
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6633 NL 3 37 °C
Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013 NA 6 37 °C
Corynebacterium insidiosum (Mc Culloch) Jensen - ATCC 10253 NL 1 27 °C
Escherichia coli K12 (Migula) Castellani et Chalmers NL 3 37 °C
Micrococcus roseus Flügge - ATCC 178 NL 3 27 °C
Mycobacterium phlei Lehmann et Neumann NL 3 37 °C
Proteus vulgaris Hausser - NCTC 4157 NL 1 37 °C
Sarcina lutea Schroeter - ATCC 381 NL 1 27 °C
Staphylococcus aureus Rosenbach - TÜ 202 NL 3 37 °C

Actinomycetales

Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici
TÜ 57 (= ETH 23575) NL 3 37 °C

4.2. Pilze

Ascomycetes

Ascoidea rubescens Brefeld - TÜ 195 NA 1 27 °C
Aspergillus panamensis Raper et Thom - TÜ 704 NA 4 27 °C
Botrytis cinerea Persoon ex Fr. - TÜ 157 NA 1 27 °C
Candida albicans (Robin) Berkhout - TÜ 164 NA 1 27 °C
Dipodascus albidus Lagerheim f. minor Korf - TÜ 192 NA 1 27 °C
Endomyces magnusii Ludwig - TÜ 167 NA 1 27 °C

Endomycopsis fibuliger (Lindner) Dekker - ATCC 9947 NA 1 27 °C
Eremothecium ashbyi Guilliermond - TÜ 173 NA 1 27 °C
Fusarium cubense Smith - TÜ 133 NA 1 27 °C
Hansenula anomala (Hansen) H. et P. Sydow - TÜ 279 NA 1 27 °C
Nadsonia fulvescens (Nadson et Konokotine) Sydow - TÜ 561 NA 1 27 °C
Nematospora coryli Peglion - ATCC 10647 NA 1 27 °C
Neurospora crassa Shear et Dodge NA 1 27 °C
Paecilomyces varioti Bainier - TÜ 137 (= ETH M4646) NA 1 27 °C
Penicillium notatum Westling NA 4 27 °C
Pichia farinosa (Lindner) Hansen - TÜ 291 NA 1 27 °C
Saccharomyces cerevisiae S288C Hansen - TÜ 125 (= ETH 108) NA 5 27 °C
Schizosaccharomyces pombe Lindner - TÜ 501 NA 1 27 °C

Basidiomycetes

Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison var. dairenensis Hasegawa et Banno - ATCC 26086 NA 5 27 °C
Rhizoctonia solani Kühn st. bas. Thanatephorus cucumeris (Frank) Donk - CBS 200.25 NA 1 27 °C

Oomycetes

Pythium debaryanum Hesse - CBS 265.38 NA 7 27 °C

Erklärungen: NA - Nähragar (siehe unter II.2.: Nährmedien)
NL - Nährlösung "

5. Kultivierung der Versuchsstämme

5.1. Aufbewahrung der Stämme

Sämtliche Stämme wurden in Schrägagarröhrchen und in Petrischalen bei 4 °C aufbewahrt.
Leucogyrophana pseudomollusca (Parm.) Parm. wuchs auf Nähragar 2 und alle übrigen Pilze auf Nähragar 1.

5.2. Submerskultur

5.2.1. Submerskultur in Schüttelkolben

Für das Screening der aufgeführten Versuchsstämme wurden 500 ml-Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich verwendet, Jeweils 130 ml Nährlösung wurden mit ca. 2 cm^2 Mycelmaterial der Versuchsstämme von Petrischalen beimpft und bei 22 °C und 135 rpm auf der Schüttelmaschine 4 Wochen lang inkubiert.

5.2.2. Submerskultur in Fermentern

Submerskultur im 10l-Fermenter

Zur Fermentation im 10l-Fermenter (Modell FS-314, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) wurden 10 l Nährlösung 1 unter Zusatz von 1 ml Niax Polyol mit ca. 400 ml einer zwei Wochen alten Kultur des Versuchsstammes angeimpft. Bei 120 rpm und einer Belüftung von 2 l Luft pro Minute wurde bei 22 °C inkubiert.

Submerskultur im 100l-Fermenter

Die vom 10l-Ansatz leicht abweichenden Bedingungen für die Kultur im 100l-Fermenter (Fermacell Fermentor F130, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) bestanden in der Zugabe von 5 ml Niax Polyol Antischaummittel, einer Belüftung von 1700 l Luft pro Stunde und einer Umdrehungsgeschwindigkeit des Rührers von 100 rpm.
Als Inoculum diente die 10 Tage alte Kultur eines 10l-Fermenters.

6. Plattendiffusionstest

Der Plattendiffusionstest, der bei Zähner (1965) beschrieben wurde, dient dem raschen Auffinden antibiotischer Aktivität, zum Beispiel in Kulturlösungen von Mikroorganismen oder Pilzen. Hierzu werden Filterrondellen (Durchmesser 6 mm) mit der antibiotikumhaltigen Lösung getränkt und nach Trocknen auf die Testplatten gelegt. Die Hemmhöfe sind, abhängig vom verwendeten Testorganismus, nach 12 - 48 Stunden abzulesen.

6.1. Testplatten mit Bakterien

In sterile Petrischalen wurden 15 ml des entsprechenden Nähragars als Unterschicht eingegossen. 5 ml des gleichen Mediums (0,5 % Agar), das 10^5 - 10^6 Testkeime enthielt, wurde anschließend bei einer Temperatur von 40 - 50 °C als Oberschicht hinzugefügt.

6.2. Testplatten mit Pilzen

Von den unter II.4.2. angegebenen Teststämmen wurden Sporen-, Zell- oder Mycelsuspensionen zu den jeweiligen Nährmedien hinzugefügt und die Testplatten einschichtig (17,5 ml) gegossen.
Die Wirkung der Antibiotika gegen Botrytis cinerea wurde nach Hütter et al. (1965) festgestellt.

7. Bestimmung des Wachstums von Pythium debaryanum

Zur Bestimmung des Wachstums von Pythium debaryanum wurden je 15 ml des Nähragars 7 mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums versetzt und in Petrischalen gegossen. Als Inoculum diente ein Agarstückchen (Durchmesser 8 mm) mit Pythium debaryanum, welches auf die Mitte des Nährbodens gesetzt wurde.

8. Verdünnungsreihentest

Der Verdünnungsreihentest wurde mit den aufgeführten Testbakterien

(mit Ausnahme von Clostridium pasteurianum, welches nur mit dem Plattendiffusionstest geprüft wurde) nach der von Kavanagh (1963) beschriebenen Methode durchgeführt.

9. Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A, B und C

Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A aus Fruchtkörpern von Merulius tremellosus Fr.

80 g lyophilisierte Fruchtkörper von Merulius tremellosus wurden pulverisiert und dreimal mit je 600 ml einer Mischung von Aceton und Methanol (1 : 1, v/v) extrahiert.

Die vereinigten Extrakte wurden auf 20 ml eingeengt, 200 ml Wasser hinzugefügt und Merulinsäure A dreimal mit je 200 ml Äthylacetat extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rohextrakt (3,8 g) in Chloroform gelöst, auf eine Kieselgelsäule (2,5 X 12 cm, Kieselgel Mallinckrodt) aufgetragen und mit Chloroform - Äthanol (99 : 1) eluiert. Die Fraktionen, die Merulinsäure A enthielten, wurden vereinigt, das Lösungsmittel abgedampft und die verbleibende Substanz noch einmal, wie oben beschrieben, an Kieselgel chromatographiert.

Das so erhaltene hellbraune Öl wurde in 7 ml Methanol aufgenommen, auf eine Säule mit Sephadex LH-20 (2,5 X 163 cm) aufgetragen und mit Methanol eluiert. Die Fraktionen mit dem Antibiotikum (Ve/Vt = 0,9 - 1,0) wurden im Vakuum eingeengt. Das Antibiotikum kristallisierte aus dem in Cyclohexan - Tetrachlorkohlenstoff (96 : 4) gelösten Rückstand aus.

Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A, B und C aus Fruchtkörpern von Phlebia radiata Fr.

38 g lyophilisierte Fruchtkörper von Phlebia radiata wurden, wie oben beschrieben, extrahiert und das Rohprodukt (3,2 g) an Kieselgel chromatographiert. Bei der Elution mit Chloroform - Äthanol (99 : 1) wurde zuerst Merulinsäure C und anschließend Merulinsäure

A und B zusammen eluiert.

Nach nochmaliger Chromatographie an Kieselgel wurde Merulinsäure C auf eine Säule mit Sephadex LH-20 (2,5 X 163 cm) aufgetragen. Nach der Elution mit Methanol (Ve/Vt = 0,76 - 0,82) wurde Merulinsäure C auf eine Säule mit Kieselgel (2,5 X 12 cm) gegeben, mit Chloroform - Äthanol - Methanol (98 : 1 : 1) eluiert und als reine farblose Substanz erhalten.

Die eingeengten Fraktionen mit Merulinsäure A und B von der ersten Chromatographie an Kieselgel wurden auf eine Säule mit Sephadex LH-20 (2,5 X 174 cm) aufgetragen und mit Methanol eluiert. Merulinsäure A (Ve/Vt = 0,9 - 1,0) wurde aus Cyclohexan - Tetrachlorkohlenstoff (96 : 4) kristallisiert.

Die Merulinsäure B enthaltenden Fraktionen (Ve/Vt = 0,8 - 0,9) wurden nochmals an Sephadex LH-20 chromatographiert und auf eine Säule mit Kieselgel (2,5 X 12 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit Chloroform - Äthanol - Methanol (98 : 1 : 1) wurde Merulinsäure B mit Chloroform - Äthanol - Methanol (94 : 1 : 5) eluiert und als reines farbloses Öl erhalten.

10. Isolierung und Reinigung von Merulidial aus Merulius tremellosus Fr.

Isolierung und Reinigung von Merulidial aus dem 10l-Fermenter

Die Nährlösung von 8 l Submerskultur wurde durch Filtration vom Mycel getrennt und dreimal mit je 2 l Äthylacetat extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rohextrakt (8,9 g) auf eine Kieselgelsäule (5 X 7 cm, Kieselgel Mallinckrodt) aufgetragen und mit Chloroform - Äthanol (99 : 1) eluiert. Die das Antibiotikum enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel abgedampft und die verbleibende Substanz (2 g) noch einmal, wie oben beschrieben, chromatographiert.

Das so erhaltene braune Öl wurde abschließend in 3 ml Chloroform aufgenommen, auf eine Kieselgelsäule (2,5 X 12 cm) aufgetragen und Merulidial mit Chloroform - Äthanol - Methanol (98 : 1 : 1) eluiert.

Isolierung von Merulidial aus dem 100l-Fermenter

Nach beendeter Fermentation wurde die Kulturflüssigkeit vom Mycel durch eine Filterpresse getrennt und anschließend dreimal mit je 15 l Äthylacetat extrahiert. Je ein Viertel des erhaltenen Rohextrakts (37 g) wurde, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, gereinigt.

11. Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfolien 60 F_{254} mit einer Schichtdicke von 0,2 mm der Firma E. Merck, Darmstadt, benutzt.

Die antibiotisch aktiven Substanzen konnten durch UV-Licht (254 nm) und durch Bioautographie, wie sie von Kirst (1971) beschrieben wurde, kenntlich gemacht werden.

Folgende Laufmittel kamen zur Anwendung:

LM 1	Benzol - Aceton - Essigsäure	70 : 30 : 1
LM 2	Benzol - Aceton - Diäthylamin	70 : 30 : 1
LM 3	Cyclohexan - Äthylacetat - Ameisensäure	120 : 40 : 5
LM 4	Chloroform	
LM 5	Chloroform - Äthylacetat - Aceton	60 : 30 : 30

12. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil und Leucin in vegetative Zellen von Bacillus brevis

Zeitabhängigkeit des Einbaus der Vorstufen

Zu 18 ml einer exponentiell wachsender Kultur von Bacillus brevis in Nährlösung 3 (E_{650} = 0,7) wurden 0,25 µCi der radioaktiv markierten Vorstufen (2-^{14}C)-Thymidin (≙ 0,99 µg), (1-^{14}C)-L-Leucin (≙ 0,56 µg) und (2-^{14}C)-Uracil (≙ 125 µg) hinzugefügt. Die Antibiotika (100µg/ml bei Merulinsäure A und C, 10 µg/ml bei Merulinsäure B) wurden 22 - 25 Minuten später zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben von 200 µl entnommen, die Zellen sofort mit 2 ml

5 %iger Trichloressigsäure gefällt, das säureunlösliche Material auf Membranfiltern (Selectron, Typ B 1785, 0,45 µ Porenweite, 23 mm Durchmesser) gesammelt, gewaschen und die Radioaktivität in je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g PPO, 0,04 g POPOP in 1 l Toluol) mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Mark I, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA) gemessen.

Einbau der Vorstufen bei konstanter Inkubationszeit und verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums

Von 60 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von Bacillus brevis in Nährlösung 3 (E_{650} = 0,9) wurden je 10 ml zu verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums gegeben und 10 Minuten bei 120 rpm im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurden je 3 mal 3 ml der einzelnen Ansätze zu 0,1 µCi (1-^{14}C)-L-Leucin (≙ 0,224 µg), 0,1 µCi (2-^{14}C)-Thymidin (≙ 0,396 µg) und 0,1 µCi (2-^{14}C)-Uracil (≙ 50 µg) hinzugefügt und in Erlenmeyerkölbchen bei 37 °C geschüttelt.

Nach weiteren 40 Minuten wurden je 0,5 ml der Zellsuspensionen mit 30 µl 50 %iger Trichloressigsäure versetzt, das säureunlösliche Material auf Membranfiltern gesammelt und mit 10 ml 5 %iger Trichloressigsäure nachgewaschen. Nach Trocknen der Filter erfolgte die Messung der Radioaktivität in je 5 ml Szintillatinsflüssigkeit (4 g PPO in 1 l Toluol) mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Betaszint BF 5000, Fa. Berthold Friesicke).

13. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uridin und Leucin in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms der Maus

Der Einbau radioaktiv markierter Vorstufen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Weitzel et al. (1967).

Einer Maus, die vier Tage zuvor mit Ascites-Zellen intraperitoneal geimpft worden war, wurden nach Töten durch Fraktur der Halswirbelsäule aus der Bauchhöhle Tumorzellen abpunktiert.

100 ml Phosphatpuffer nach Martin et al. (1961) wurden mit 1700 I.E. Heparin-Natrium versetzt und soviel Asciteszellen hinzugefügt, daß die Endkonzentration ca. 1,5 - 2 X 10^6 Zellen pro Milliliter betrug.

Phosphatpuffer:	Lösung A	NaCl	10,0 g
		KCl	0,1 g
		Na_2HPO_4 X H_2O	1,8 g
		KH_2PO_4	0,25 g
		H_2O	1,0 l
	Lösung B	$MgCl_2$ X $6H_2O$	0,5 g
		H_2O	0,5 l
	Lösung C	$CaCl_2$ X $2H_2O$	0,66 g
		H_2O	0,5 l

Die Lösungen A, B und C werden im Verhältnis 40 : 5 : 5 gemischt und vor Gebrauch noch 10 mg Glucose pro 100 ml Phosphatpuffer hinzugefügt.

Nach Zugabe von je 10 ml dieser Zellsuspension zu verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums wurde 10 Minuten bei 37 °C geschüttelt (120 rpm).

Je 3 mal 3 ml der vorinkubierten Ansätze wurden zu 0,1 µCi (2-^{14}C)-Thymidin (≙ 0,99 µg), (2-^{14}C)-Uridin (≙ 0,46 µg) und (1-^{14}C)-L-Leucin (≙ 0,224 µg) in kleine Reagenzgläser gegeben und bei 37 °C leicht geschüttelt. Nach weiteren 20 Minuten wurde zentrifugiert (3000 rpm, 1 Minute), der Überstand verworfen und die abgesetzten Zellen in 3 ml 5 %iger Trichloressigsäure resuspendiert. Nach Absaugen über Membranfilter (Selectron, Typ B 1785, Porengröße: 0,45 µ, Durchmesser: 23 mm) und Nachwaschen mit 10 ml 5 %iger Trichloressigsäure wurde die Radioaktivität in je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g PPO in 1 l Toluol) mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Betaszint BF 5000, Fa. Berthold Friesicke) gemessen.

14. Test auf hämolytische Aktivität

Dieser Test wurde mit aus der Armvene entnommenem, heparinisiertem (100 I.E./ml) Blut in Anlehnung an die Hämiglobincyanidmethode (Merck, 1974) durchgeführt.

Folgende Reaktionslösungen kamen zur Anwendung:

(a; Merck Nr. 3317)	1,0 mM/l	Kaliumcyanid
	0,6 mM/l	Kaliumhexacyanoferrat-(III)
	2,5 mM	Phosphatpuffer, pH 7,2
	1,5 mM/l	Natriumchlorid
	0,05 %	Detergens
(b)	1,0 mM/l	Natriumcyanid
	0,6 mM/l	Kaliumhexacyanoferrat-(III)
	2,5 mM	Phosphatpuffer, pH 7,2
		hergestellt aus: 2,5 mM/l Na_2HPO_4
		2,5 mM/l NaH_2PO_4
	141,3 mM/l	Natriumchlorid

Zur Ausführung wurden je 5 ml der isotonischen Reaktionslösung (b) mit verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika kurz geschüttelt, 20 µl Blut hinzugefügt, geschüttelt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden danach 5 Minuten bei 900 g zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 546 nm gegen die Reaktionslösung (b) als Leerwert gemessen. Der Kontrollwert mit der Reaktionslösung (a) wurde gleich behandelt. Die Hämolyse dieses Kontrollwertes wurde bei der Berechnung als 100 % zugrunde gelegt.

15. Prüfung auf Mutagenität

Der Test auf mutagene Eigenschaften wurde nach Ames et al. (1975) ausgeführt. Als Testorganismen wurden vier his^- Mutanten von Salmonella typhimurium LT 2 verwendet [+)], deren Eigenschaften kurz er-

---

+) Die benötigten Teststämme wurden freundlicherweise von Dr. B. N. Ames, Biochemistry Department, University of California, Berkeley, California 94720, USA, zur Verfügung gestellt.

läutert werden sollen: Die Stämme TA 1535 und TA 100 dienen zum Nachweis von Basenpaarungsfehlern und TA 1537 und TA 98 lassen Rasterverschiebungen durch entsprechende Mutagene erkennen. Weiterhin haben diese Stämme das Excisions-Reparatursystem verloren und entbehren der Lipopolysaccharidschicht. Diese beiden zusätzlichen Defekte erhöhen die Sensibilität gegenüber mutagenen Substanzen, die bei TA 100 und TA 98 durch das Vorhandensein eines R-Faktors gegen Penicillin noch weiter gesteigert ist.

Die Mutagenität einer Substanz wird schließlich durch das Auftreten von his^+ Revertanten sichtbar.

15.1. Herstellung der Testplatten

In Petrischalen wurden als Unterschicht 17,5 ml Nähragar 8 eingegossen (mod. nach Ames et al., 1975). Dem für je 20 Platten vorbereiteten Nähragar 9 wurde nach Verflüssigung noch 1 ml einer 1 mM L-Histidin-HCl-Lösung , 1 ml einer 1 mM Biotinlösung und 2 ml einer Übernachtkultur des Teststammes (Titer: 2 - 4 X 10^8 Zellen/ml) in Nährlösung 3 hinzugefügt. Bei maximal 45 ^{o}C wurden hiervon je 2 ml als Oberschicht in die Platten gegossen.

Das der Oberschicht beigegebene Histidin soll die zur Ausprägung des durch Mutation entstandenen Phänotyps notwendigen Zellteilungen ermöglichen. Weiterhin erlaubt der dadurch verursachte Background auch zu erkennen, inwieweit die geprüfte Substanz den Teststamm hemmt.

15.2. Nachweis der Mutagenität im Plattendiffusionstest

In die Mitte der nach 15.1. vorbereiteten Platten wurden Filterrondellen mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums gelegt. Nach ca. 48 Stunden konnte das Ergebnis an Hand des Auftretens von Revertanten um die Rondelle abgelesen werden. Als Kontroll-Mutagen diente für die Stämme TA 100 und TA 1535 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin.

15.3. Nachweis der Mutagenität durch Eingießen des Antibiotikums

Um die mutagene Wirkung zu quantifizieren, wurden zu der nach 15.1. hergestellten Oberschicht verschiedene Konzentrationen des Antibiotikums hinzugefügt. Nach 48 Stunden wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien gezählt. Diese Zahl, abzüglich der durch Spontanmutationen gewachsenen Kolonien, stellte somit die Anzahl der durch das Antibiotikum hervorgerufenen Revertanten pro Platte dar.

16. Versuche mit dem Biophotometer

Verwendet wurde bei diesem Versuch das Biophotometer von Bonet-Maury und Jouan, welches ausführlich von Coultas et al. (1962) beschrieben wurde. Zu Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration wurden 0,5 ml einer Übernachtkultur von Bacillus brevis in Nährlösung 3 zu 40 ml des gleichen Mediums gegeben. Je 7 ml dieser Verdünnung wurden in die Küvetten des Biophotometers gefüllt und bei 37 ^{o}C und maximaler Belüftung inkubiert. Nach 2,5 Stunden wurden bei einer Transmission von 50 % in der Mitte der log-Phase verschiedene Mengen des Antibiotikums zu den Bakteriensuspensionen gegeben und weitere 22 Stunden inkubiert.

17. Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Zeiss Spektralphotometer PMQ III angefertigt.

Mit einem Perkin Elmer Spektrograph, Modell 137, wurden die IR-Spektren aufgenommen.

Die Massenspektren wurden im Institut für Organische Chemie der Universität Bonn angefertigt. Für deren Überlassung möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. W. Steglich und Herrn B.M. Giannetti danken.

III. Ergebnisse

A. Merulinsäure A, B und C

1. Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A, B und C aus Fruchtkörpern von Merulius tremellosus Fr. und Phlebia radiata Fr.

Die Isolierung und Reinigung von Merulinsäure A, B und C durch Adsorptionschromatographie an Kieselgel und durch das Molekularsieb LH-20 wurde ausführlich unter Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 1 gibt den Gehalt an Merulinsäure A, B und C in den Fruchtkörpern wieder. Die Prozentangaben beziehen sich dabei auf die Trokkengewichte der lyophilisierten Fruchtkörper.

Tabelle 1: Absoluter (mg) und relativer (%) Gehalt an Merulinsäure A, B und C

Antibiotikum	Merulius tremellosus		Phlebia radiata	
	mg	%	mg	%
Merulinsäure A	250	0,31	60	0,16
Merulinsäure B	-	-	100	0,26
Merulinsäure C	-	-	800	2,07

2. Physikalisch-chemische Eigenschaften

2.1. Schmelzpunkte

Merulinsäure A bildet farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 116 - 117 °C. Merulinsäure B ist bei Raumtemperatur ein farbloses Öl und die kristalline Merulinsäure C schmilzt bei 32 °C.

2.2. Löslichkeiten

Merulinsäure A und B sind gut löslich in Chloroform, Diäthyläther, Äthylacetat, Methanol, 0,1N $KHCO_3$, 0,1N K_2CO_3 und 0,1N NaOH, schlecht löslich in Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff und Wasser.

Merulinsäure C ist ferner gut löslich in Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther.

2.3. Chromatographisches Verhalten

In Tabelle 2 sind die R_f-Werte in verschiedenen Laufmitteln an Kieselgel 60 F_{254} (Alufolien, Merck Nr. 5554) wiedergegeben.

Tabelle 2: R_f-Werte von Merulinsäure A, B und C

Laufmittel +)	R_f-Wert		
	A	B	C
LM 1	0,68	0,51	0,57
LM 2	0	0	0,10
LM 3	0,71	0,60	0,73
LM 4	0	0	0
LM 5	0,42	0,11	0,29

+) genaue Angaben siehe unter II.11.

Die Merulinsäuren geben positive Reaktionen mit 50 %iger Phosphorsäure (nach Erhitzen rotgelb), Eisen-(III)-chlorid (rotbraun), Bromkresolgrün (hell, nach Erwärmen) und Anisaldehyd-Schwefelsäure (orangerot, nach Erwärmen).

2.4. UV-Spektren

In den Abbildungen 1 - 3 sind die UV-Spektren der Merulinsäuren dargestellt. Die Spektren wurden in Methanol, in 0,1N HCl in Methanol und in 0,1N KOH in Methanol aufgenommen. Die genauen Maxima λ_{max} (nm) und die molaren Extinktionskoeffizienten (ε) sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: UV-Absorptionsmaxima der Merulinsäuren

	λ_{max} (ε)		
	in Methanol	in 0,1N HCl in Methanol	in 0,1N KOH in Methanol
Merulinsäure A	299 (4187) 259 (9797)	301 (4735) 262 (12250)	300 (8765) 272 (13531)
Merulinsäure B	309 (3193) 243 (5098)	312 (3388) 244 (5581)	300 (3794) -
Merulinsäure C	308 (3221) 243 (5098)	312 (3273) 244 (5363)	300 (3670) -

2.5. IR-Spektren

Das in Abbildung 4 wiedergegebene IR-Spektrum von Merulinsäure A wurde in KBr aufgenommen. Merulinsäure B und C wurden als Öle auf ein NaCl-Fenster aufgetragen und so die IR-Spektren gemessen (Abbildungen 5 - 6).

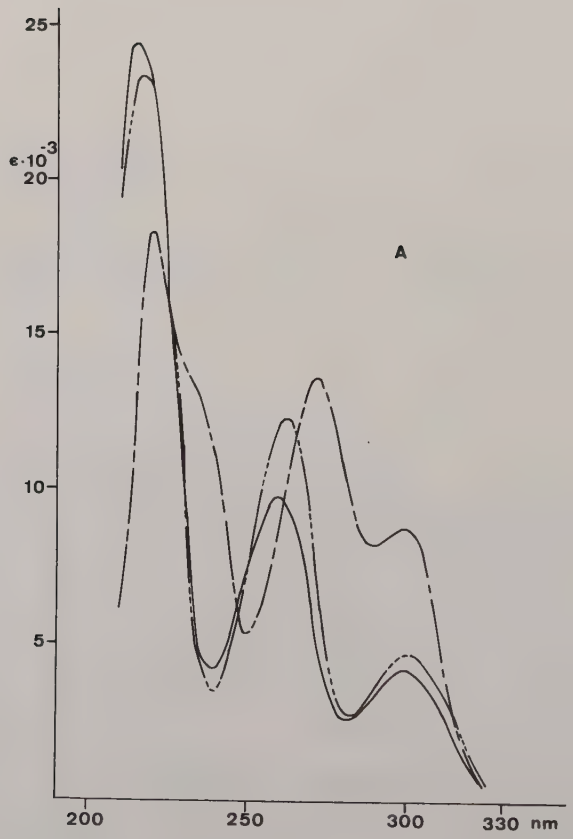


Abb. 1: UV-Spektren von Merulinsäure A

in Methanol : ——————

in 0,1N KOH in Methanol: —— — ——

in 0,1N HCl in Methanol: —— - - - ——

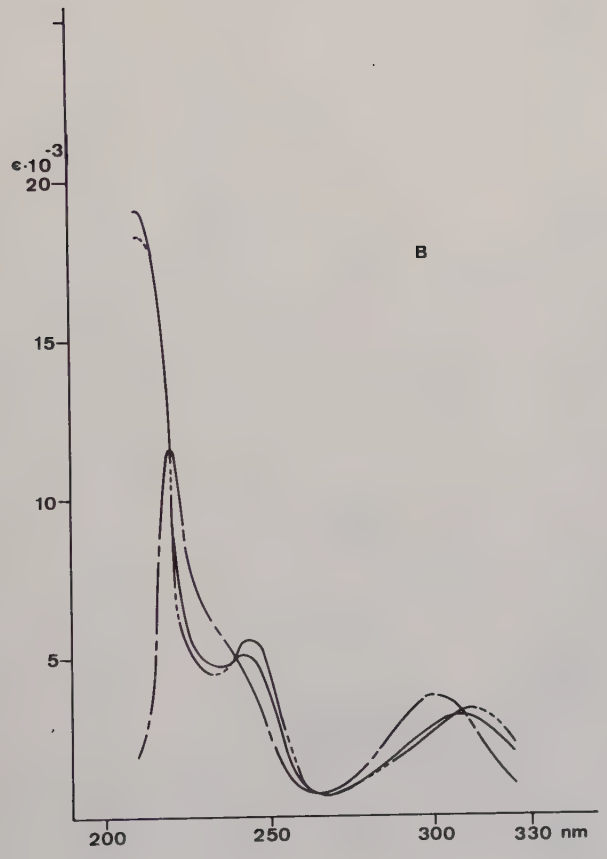


Abb. 2: UV-Spektren von Merulinsäure B

in Methanol : ————————

in 0,1N KOH in Methanol: —— — ——

in 0,1N HCl in Methanol: —— - - - ——

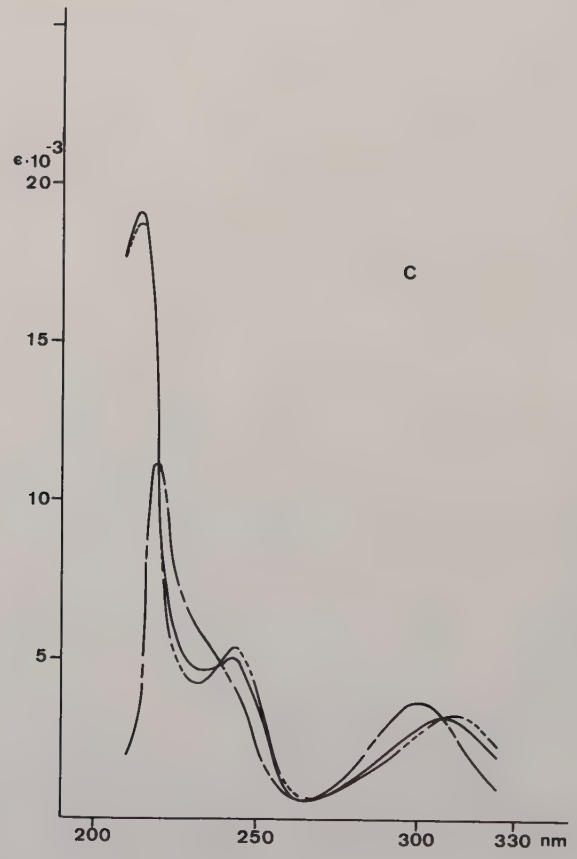


Abb. 3: UV-Spektren von Merulinsäure C

in Methanol : ————————

in 0,1N KOH in Methanol: —— — ——

in 0,1N HCl in Methanol: —— - - - ——

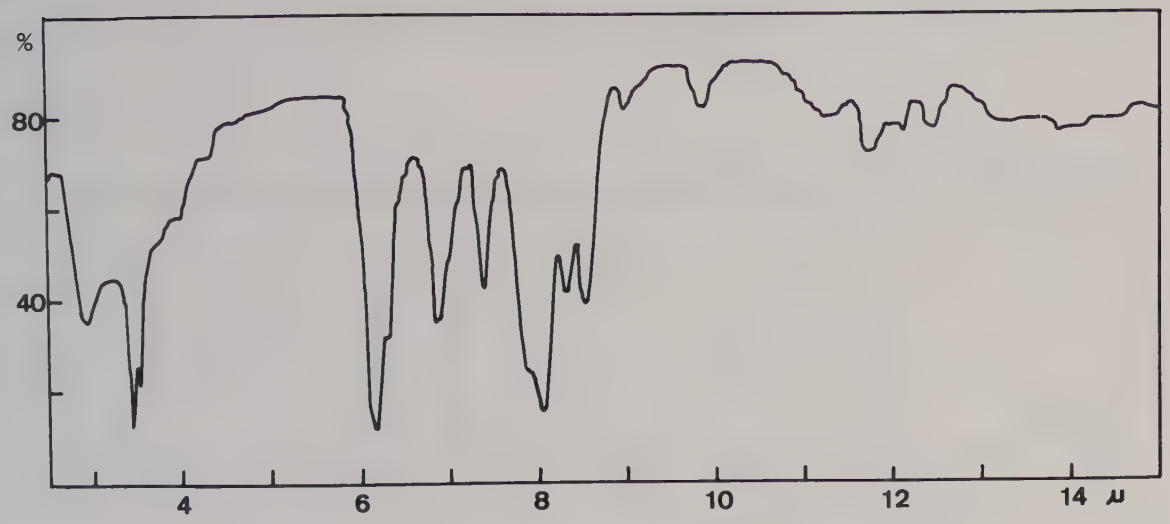


Abb. 4: IR-Spektrum von Merulinsäure A

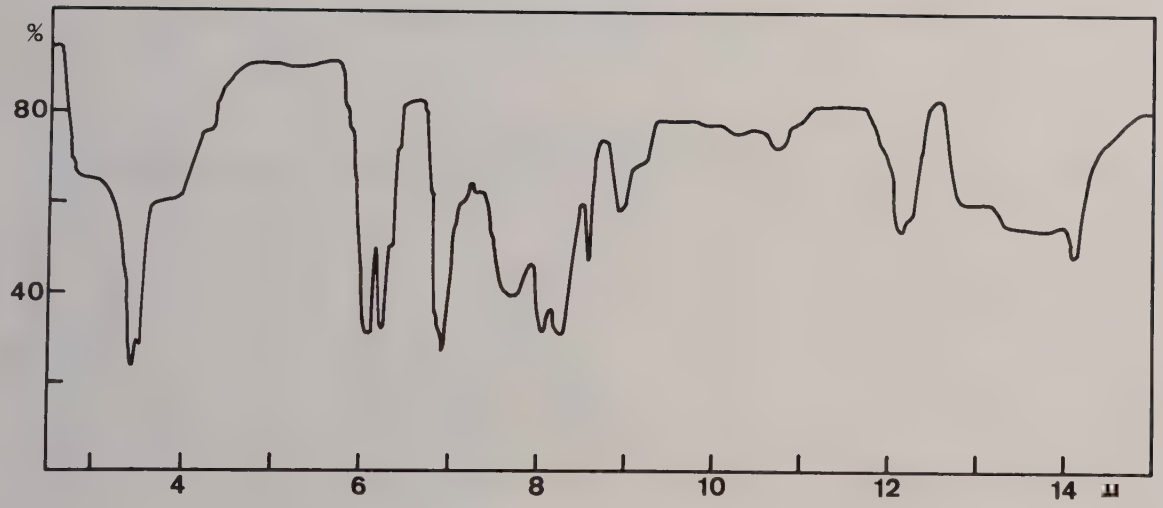


Abb. 5: IR-Spektrum von Merulinsäure B

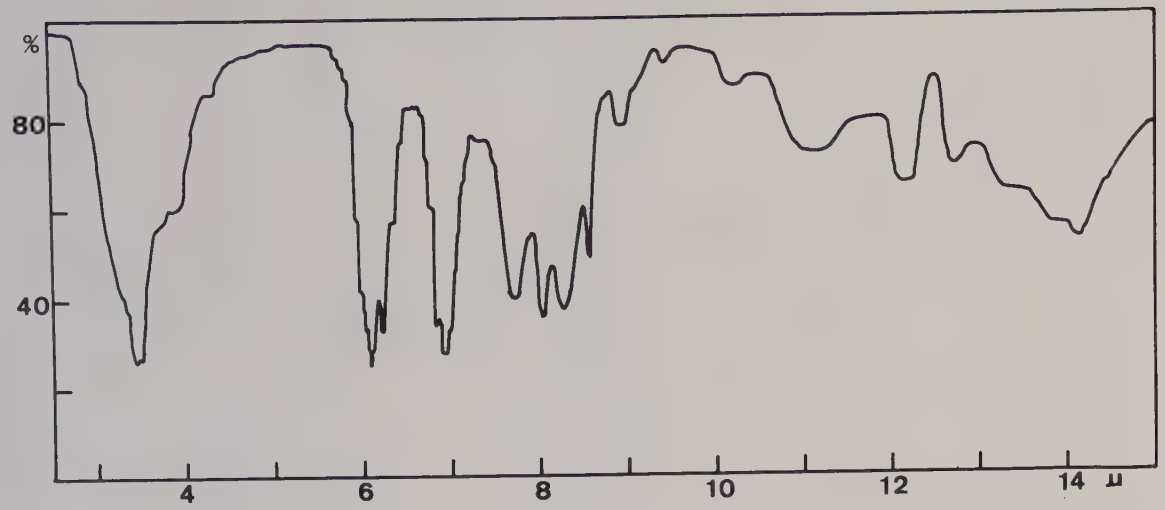


Abb. 6: IR-Spektrum von Merulinsäure C

2.6. Massenspektren

Die Abbildungen 7 - 9 zeigen die Massenspektren der Merulinsäuren (siehe auch unter II.17.). Die Hochauflösung der Spektren ergab die Molekülionen m/e = 390 (Merulinsäure A), 390 (Merulinsäure B) und 374 (Merulinsäure C). Die sich daraus ableitenden Summenformeln lauten: $C_{24}H_{38}O_4$ (Merulinsäure A und B) und $C_{24}H_{38}O_3$ (Merulinsäure C).

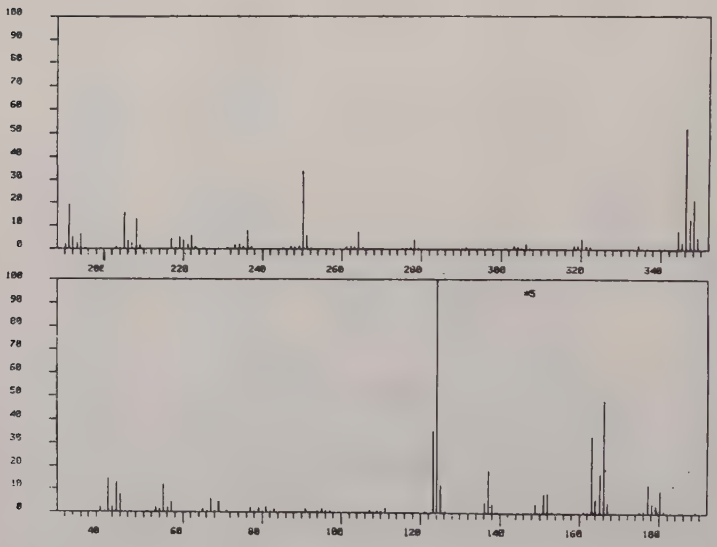


Abb. 7: Massenspektrum von Merulinsäure A

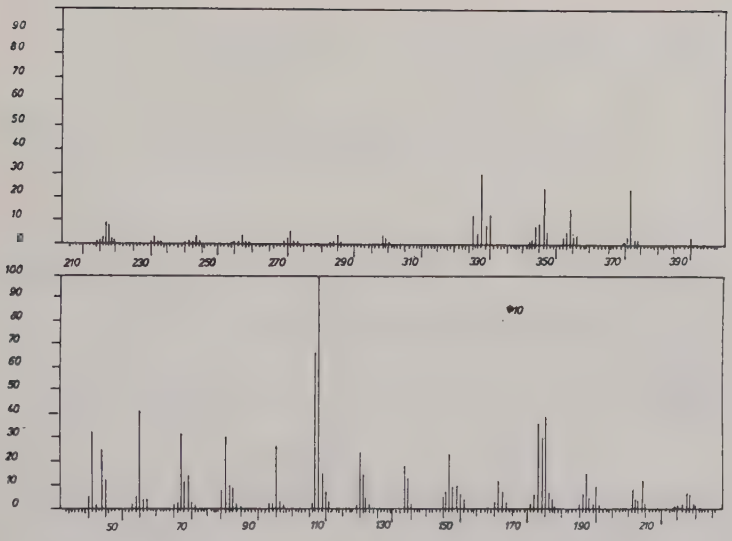


Abb. 8: Massenspektrum von Merulinsäure B

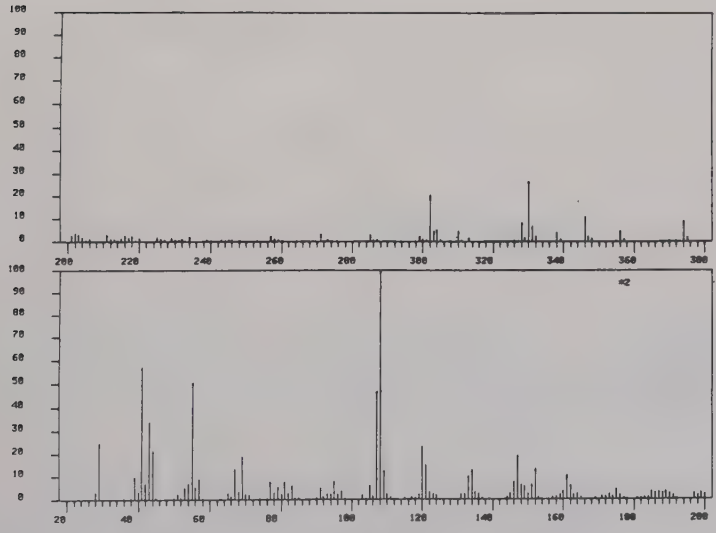


Abb. 9: Massenspektrum von Merulinsäure C

3. Strukturen

Die im folgenden dargestellten Strukturen der Merulinsäuren (Abbildungen 10 -12) wurden von Herrn B.M. Giannetti und Herrn Prof. Dr. W. Steglich, Institut für Organische Chemie der Universität Bonn, ermittelt. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen und des Meruli-dials waren das Thema der Diplomarbeit von Herrn B.M. Giannetti (Giannetti, 1978).

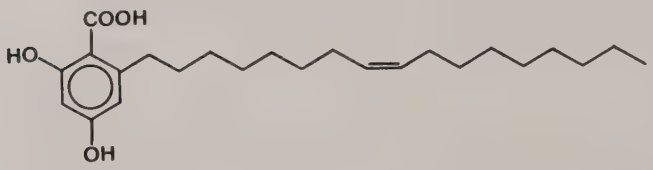


Abb. 10: Merulinsäure A

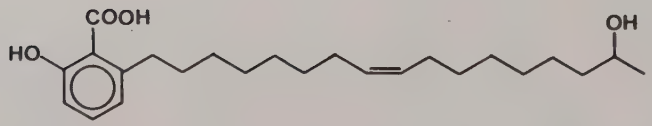


Abb. 11: Merulinsäure B

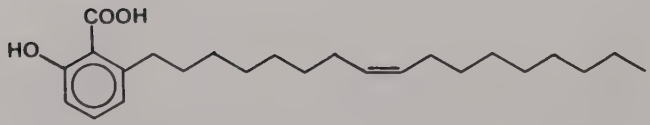


Abb. 12: Merulinsäure C

4. Wirkungsspektren

Tabelle 4 zeigt die Wirkungsspektren der Merulinsäuren

Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentrationen von Merulinsäure A, B und C (Verdünnungsreihentest)

Testorganismus	MHK (µg/ml)		
	A	B	C
- Pseudomonadales			
Pseudomonas fluorescens	>100	>100	>100
- Eubacteriales, Gram-negativ			
Aerobacter aerogenes	>100	>100	>100
Escherichia coli	>100	>100	>100
Proteus vulgaris	10 - 100	1 - 10	>100
Eubacteriales, Gram-positiv			
Arthrobacter citreus	0,4 - 0,6	1 - 2	1 - 2
Bacillus brevis	20 - 40	1 - 10	10 - 100
Bacillus subtilis	0,8 - 1,0	1 - 10	10 - 100
Corynebacterium insidiosum	1 - 10	1 - 10	10 - 100
Micrococcus roseus	1 - 10	0,4 - 0,6	0,6 - 0,8
Sarcina lutea	1 - 10	1 - 10	1 - 10
Staphylococcus aureus	10 - 100	1 - 10	>100
- Actinomycetales			
Streptomyces viridochromogenes	10 - 100	1 - 10	10 - 100

Die Merulinsäuren hemmen das Wachstum Gram-positiver und zum Teil Gram-negativer Bakterien. Mycobacterium phlei wird nur durch Merulinsäure B und C gehemmt, während sich für Merulinsäure C kein Einfluß auf das Wachstum von Staphylococcus aureus und Proteus vulgaris nachweisen läßt.

Clostridium pasteurianum und die folgenden Pilze konnten im Plattendiffusionstest durch 100 µg Merulinsäure A, B oder C nicht gehemmt werden: Aspergillus panamensis, Botrytis cinerea, Candida albicans, Fusarium cubense, Neurospora crassa, Paecilomyces varioti, Penicillium notatum, Pythium debaryanum, Rhizoctonia solani, Rhodotorula glutinis var. dairenensis und Saccharomyces cerevisiae.

5. Einfluß der Merulinsäuren auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo

Der Einfluß der Merulinsäuren auf die Makromolekülsynthesen in vegetativen Zellen von Bacillus brevis wurde nach der unter II.12. (Zeitabhängigkeit des Einbaus der Vorstufen) gegebenen Vorschrift untersucht.

In Abbildung 13 ist die Zeitabhängigkeit der Merulinsäure A-Wirkung auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese bei konstanter Konzentration des Antibiotikums wiedergegeben.

Es werden alle drei Synthesen zur gleichen Zeit gehemmt. Den hier für Merulinsäure A dargestellten Effekt zeigen auch Merulinsäure B un C in gleichem Ausmaß.

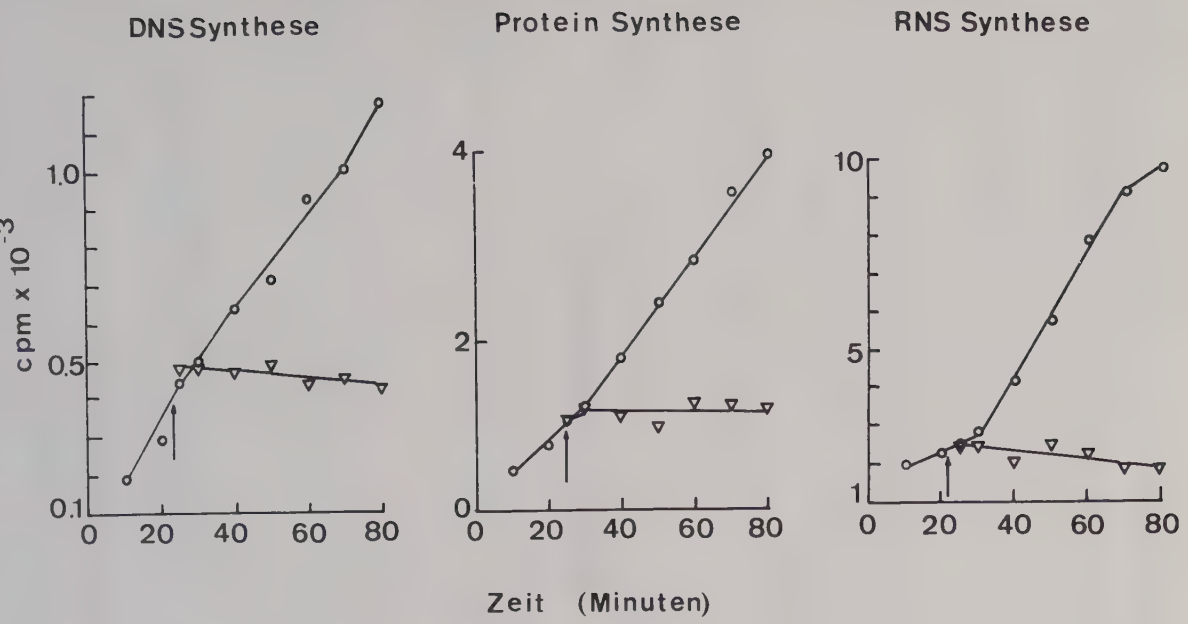


Abb. 13: Wirkung der Merulinsäure A auf die Makromolekülsynthesen von Bacillus brevis-Zellen in vivo. Zugabe des Antibiotikums: Pfeil

Kontrolle: o———o

100 µg/ml (= MHK): ▽———▽

6. Hämolytische Eigenschaften

Das Ergebnis der nach II.14. ausgeführten Prüfung auf hämolytische Aktivität ist in Abbildung 14 wiedergegeben. Die angegebenen prozentualen Hämolysewerte beziehen sich auf totale Hämolyse (= 100 %), die bei Hypotonie der Kontrollösung und Zusatz eines Detergens erreicht wurde.

Die Merulinsäuren wirken stark hämolytisch. Während die maximalen Hämolysewerte von Merulinsäure B und C (91 % beziehungsweise 93 %) bereits bei einer Konzentration von 25 µg/ml erreicht werden, tritt eine 93 %ige Hämolyse durch Merulinsäure A erst bei einer Konzentration von 73 µg/ml ein.

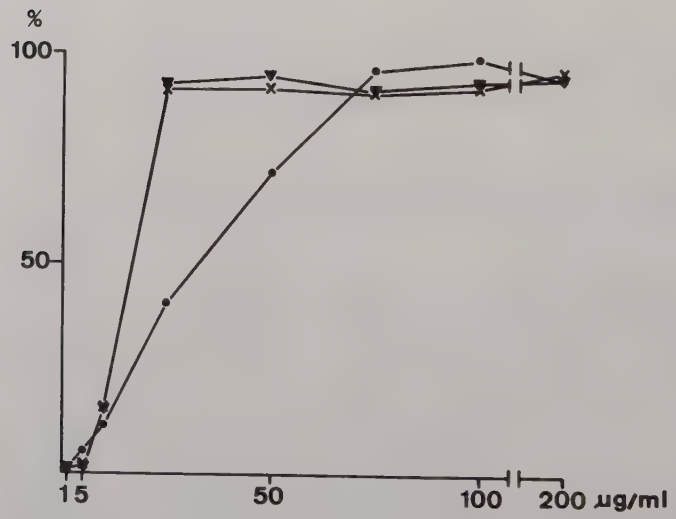


Abb. 14: Hämolytische Aktivität der Merulinsäuren

●——● Merulinsäure A
x——x " B
▼——▼ " C

7. Vergleich der antibiotischen Aktivität der Merulinsäure A mit der ihres Trimethylderivates

Um weiter Aufschluß über die Wirkungsweise der Merulinsäuren zu erhalten, wurde die Aktivität von Merulinsäure A gegen Penicillium notatum, Bacillus brevis und Bacillus subtilis mit der ihres Trimethylderivates im Plattendiffusionstest verglichen.

Tabelle 5 zeigt, daß der bei den phenolischen Hydroxylgruppen methylierte Merulinsäure A-methylester seine antibiotische Aktivität verloren hat.

Tabelle 5: Vergleich der Hemmhofdurchmesser von Merulinsäure A mit denen ihres Trimethylderivates

	Merulinsäure A				Merulinsäure A Trimethylderiv.			
	µg Antibiotikum/Rondelle							
	20	50	100	200	20	50	100	200
Testorganismus	Hemmhofdurchmesser in mm							
Penicillium notatum	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	9	9	11	12	-	-	-	-
Bacillus brevis	8	9	10	11	-	-	-	-

B. Screening

Sämtliche unter II.3. aufgeführten Versuchsstämme wurden einem Screening nach den unter II.5.2.1. angegebenen Bedingungen unterworfen.

Als Nährmedien kamen bei allen Stämmen die Nährlösungen 1 und 2 zur Anwendung. Während einer Dauer von vier Wochen wurden die Kulturen nach Beginn des Wachstums jeden zweiten Tag gegen folgende Testorganismen auf antibiotische Aktivität geprüft: Bacillus subtilis, Bacillus brevis, Escherichia coli und Aspergillus panamensis oder Penicillium notatum.

Im Verlaufe des Screenings zeigte der Stamm WQ 568 von Merulius tremellosus Fr. eine schwache Aktivität gegen Bacillus subtilis und Bacillus brevis. Dieser Stamm wurde zur weiteren Fermentation, beziehungsweise Produktion von Merulidial angezogen.

Bei allen übrigen getesteten Versuchsstämmen konnte Merulidial nicht nachgewiesen werden.

C. Merulidial

1. Fermentation

Die Fermentation wurde unter den bei II.5.2.2. angegebenen Bedingungen durchgeführt. Nach Beginn des Wachstums (beim 10l-Fermenter nach sechs Tagen, beim 100l-Fermenter nach drei Tagen) wurden täglich Proben von 100 ml entnommen. Da die Aktivität im Kulturfiltrat nur schwer zu erkennen war, wurden die Proben zweimal mit je 100 ml Äthylacetat ausgeschüttelt und der Extrakt nach Verdampfen des Lösungsmittels wieder in 4 ml Äthylacetat aufgenommen. Diese 25-fach konzentrierte Lösung wurde schließlich im Test gegen Bacillus subtilis eingesetzt.

Das Maximum der antibiotischen Aktivität wurde im 10l-Fermenter nach 12 - 14 Tagen, im 100l-Fermenter nach 6 Tagen bei einer Glucosekonzentration von 0 % erreicht.

Eine genaue Wachstumskurve an Hand des Mycelgewichtes ließ sich

auch bei größeren Probenahmen nicht aufstellen, da infolge der groben Verteilung des Mycels die Gewichtsschwankungen zu groß waren.

2. Isolierung und Reinigung

Nach Extraktion des Kulturfiltrats mit Äthylacetat wurde die Isolierung und Reinigung durch mehrmalige Chromatographie an Kieselgel, wie unter II.10. beschrieben, durchgeführt. Ein Reinigungsversuch mit Sephadex LH-20 und Methanol als Elutionsmittel brachte keinen Erfolg, sondern führte zu 50 %igem Zerfall des Merulidials.

Die Ausbeute an Merulidial aus dem 10l-Ansatz betrug 0,8 g und aus dem 100l-Ansatz 4,3 g.

Im eingeengten Mycelextrakt konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

3. Physikalisch-chemische Eigenschaften

3.1. Schmelzpunkt

Das stets als farbloses reines Öl erhaltene Merulidial kristallisiert nach 2 - 3 Monaten bei -18 °C aus. Die so gewonnenen würfelförmigen Kristalle besitzen einen Schmelzpunkt von 34 °C.

3.2. Löslichkeit

Merulidial löst sich gut in Chloroform, Diäthyläther, Äthylacetat und Methanol, schlecht in Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff und Wasser.

3.3. Chromatographisches Verhalten

Tabelle 6 zeigt die R_f-Werte von Merulidial an Kieselgel 60 F_{254} (Alufolien, Merck Nr. 5554) in verschiedenen Systemen.

Tabelle 6: R_f-Werte von Merulidial in verschiedenen Laufmitteln

Laufmittel +)	R_f-Wert
LM 1	0,67
LM 2	0,71
LM 3	0,11
LM 4	0,08
LM 5	0,84

+) genaue Angaben siehe unter II.11.

Merulidial gibt positive Reaktionen mit Antimon-(III)-chlorid (blau), 50 %iger Phosphorsäure (violett), Anilinphthalat (gelb, nach Erhitzen blau), Kaliumpermanganat (entfärbt) und Anisaldehyd-Schwefelsäure (dunkelrot).

3.4. UV-Spektrum

In Abbildung 15 ist das UV-Spektrum von Merulidial in Methanol wiedergegeben.

Es zeigt ein Absorptionsmaximum bei 270 nm (ε = 3660).
Weder in 0,1N HCl in Methanol noch in 0,1N KOH in Methanol konnte von Merulidial ein UV-Spektrum aufgenommen werden (Zersetzung der Substanz).

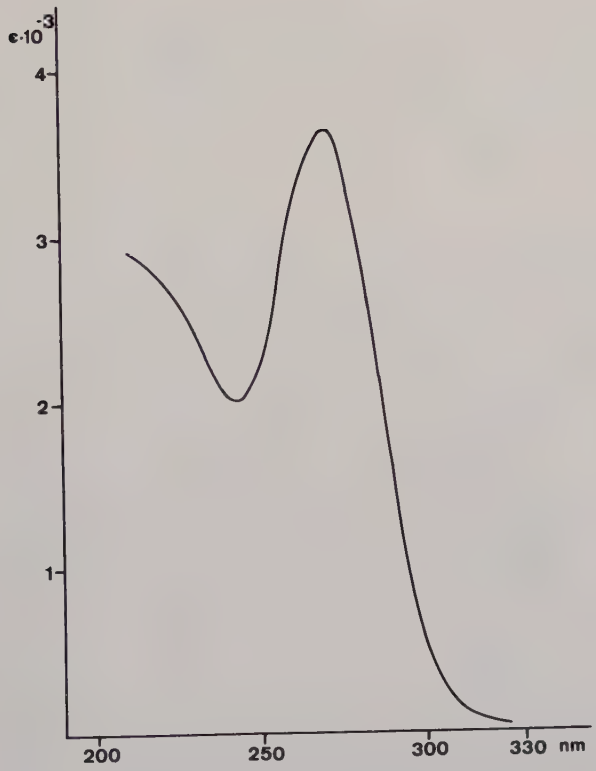


Abb. 15: UV-Spektrum von Merulidial

3.5. IR-Spektrum

Das in Abbildung 16 dargestellte IR-Spektrum von Merulidial wurde mit der Substanz auf einem Natriumchloridfenster aufgenommen.

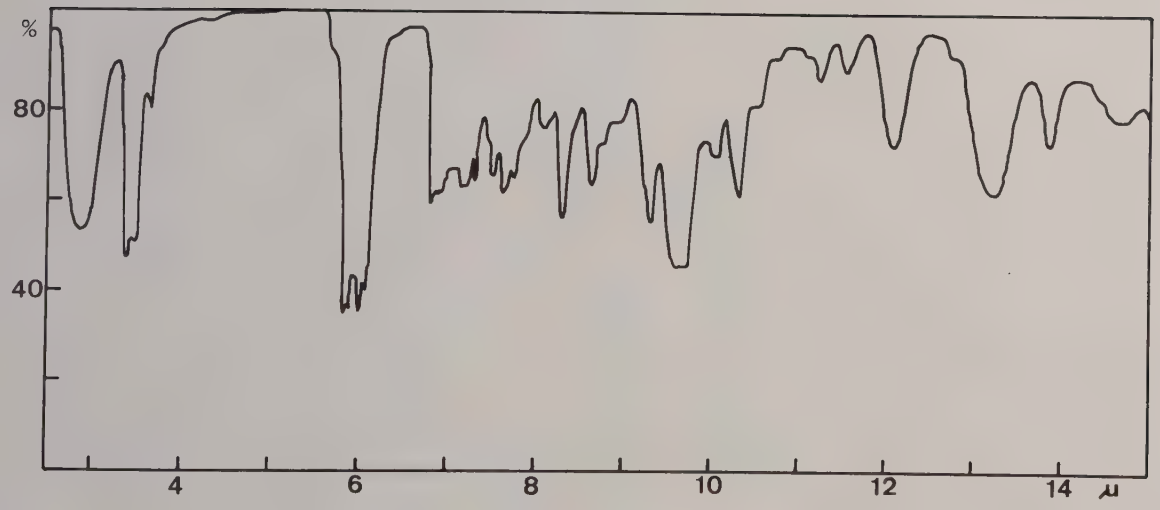


Abb. 16: IR-Spektrum von Merulidial

3.6. Massenspektrum

Abbildung 17 zeigt das Massenspektrum von Merulidial mit einem Molekülion m/e = 248 und der Zusammensetzung $C_{15}H_{20}O_3$ (siehe auch unter II.17.).

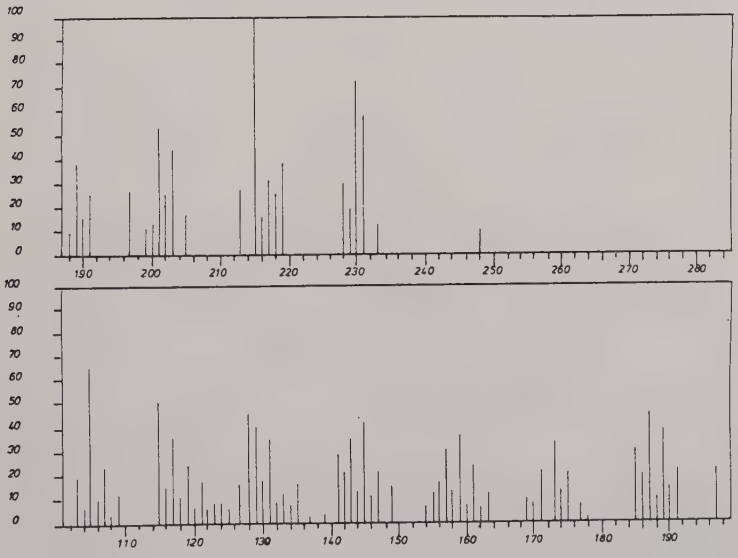


Abb. 17: Massenspektrum von Merulidial

4. Struktur

Die von Herrn B.M. Giannetti und Herrn Prof. W. Steglich ermittelte Strukturformel von Merulidial ist in Abbildung 18 wiedergegeben.

Die absolute Konfiguration wird derzeit noch untersucht (Giannetti et Steglich, 1977).

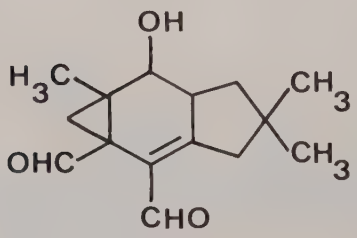


Abb. 18: Merulidial

5. Wirkungsspektren

5.1. Wirkungsspektrum bei Bakterien

Tabelle 7 zeigt das Wirkungsspektrum von Merulidial bei Bakterien im Verdünnungsreihentest.

Tabelle 7: Minimale Hemmkonzentrationen von Merulidial bei Bakterien (Verdünnungsreihentest)

Testorganismus	MHK (µg/ml)
- Pseudomonadales	
Pseudomonas fluorescens	>100
- Eubacteriales, Gram-negativ	
Aerobacter aerogenes	>100
Escherichia coli	>100
Proteus vulgaris	10
Eubacteriales, Gram-positiv	
Arthrobacter citreus	10 - 100
Bacillus brevis	43 - 71
Bacillus subtilis	10 - 100
Corynebacterium insidiosum	10 - 100
Micrococcus roseus	1 - 10
Mycobacterium phlei	>100
Sarcina lutea	10 - 100
Staphylococcus aureus	>100
- Actinomycetales	
Streptomyces viridochromogenes	10

Merulidial ist aktiv gegen Arthrobacter citreus, Bacillus brevis, Bacillus subtilis, Corynebacterium insidiosum, Sarcina lutea und Streptomyces viridochromogenes (Gram-positive Bakterien) und gegen Proteus vulgaris (Gram-negatives Bakterium). Die minimale Hemm-

konzentration von Bacillus brevis wurde durch Biophotometrie festgestellt.

Clostridium pasteurianum wurde im Plattendiffusionstest bei einer Konzentration von 100 µg nicht gehemmt.

5.2. Wirkungsspektrum bei Pilzen

Das Wirkungsspektrum von Merulidial bei Pilzen wurde im Plattendiffusionstest mit 1, 10 und 100 µg Antibiotikum pro Filterrondelle erstellt.

Bei den Konzentrationen 1 und 10 µg wurde keiner der getesteten Pilze beeinflußt.

Die Hemmung durch 100 µg Merulidial pro Rondelle ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8: Wirkungsspektrum von Merulidial bei Pilzen (Plattendiffusionstest)

Testorganismus	Durchmesser der Hemmzone (mm)
- Ascomycetes	
Ascoidea rubescens	25
Aspergillus panamensis	20
Botrytis cinerea	-
Candida albicans	11
Dipodascus albidus	-
Endomyces magnusii	16 i
Endomycopsis fibuliger	14 i
Eremothecium ashbyi	38

Tabelle 8 (Fortsetzung)

Testorganismus	Durchmesser der Hemmzone (mm)
- Ascomycetes	
Fusarium cubense	11
Hansenula anomala	8 i
Nadsonia fulvescens	-
Nematospora coryli	21
Neurospora crassa	19
Paecilomyces varioti	10
Penicillium notatum	12
Pichia farinosa	-
Saccharomyces cerevisiae	20
Schizosaccharomyces pombe	8
- Basidiomycetes	
Rhizoctonia solani	20
Rhodotorula glutinis	9
- Oomycetes	
Pythium debaryanum	siehe unter III.6.

i = inkomplette Hemmzone

6. Einfluß auf das Wachstum von Pythium debaryanum

Um das Wachstum von Pythium debaryanum und dessen Beeinflussung durch Merulidial zu bestimmen, wurden nach II.7. Platten herge-

stellt und mit 10 und 100 µg Antibiotikum pro Milliliter Nährmedium versetzt. In Abbildung 19 ist der Durchmesser der Riesenkolonie in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wiedergegeben.

Wie zu sehen ist, beeinflußt Merulidial das Wachstum von Pythium debaryanum bei einer Konzentration von 100 µg/ml deutlich, während 10 µg/ml kaum einen Effekt zeigen.

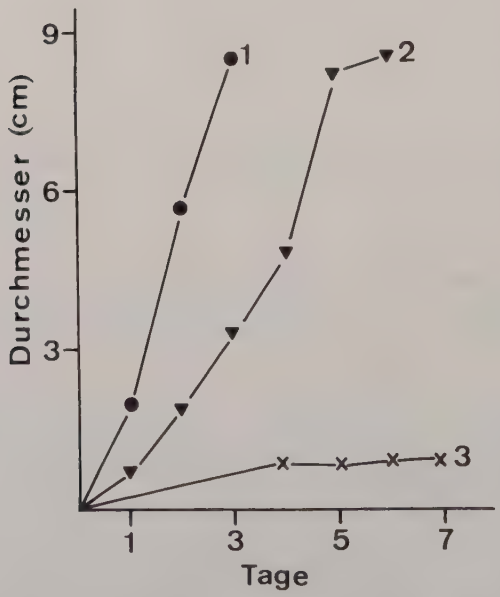


Abb. 19: Einfluß des Merulidials auf das Wachstum von Pythium debaryanum

1: Kontrolle ohne Antibiotikum
2: 10 µg Merulidial/ml
3: 100 µg Merulidial/ml

7. Biophotometerversuch

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Merulidial bei Bacillus brevis wurden 21, 43, 71 und 100 µg Merulidial/ml zu den Bakteriensuspensionen bei einer Transmission von 50 % zugefügt (siehe auch unter II.16.). Wie Abbildung 20 zeigt, hemmen 71 µg/ml, beziehungsweise 100 µg/ml bereits nach 15 Minuten das Wachstum, während 43 µg/ml praktisch ohne Einfluß sind. Die minimale Hemmkonzentration liegt somit zwischen 43 und 71 µg Merulidial/ml.

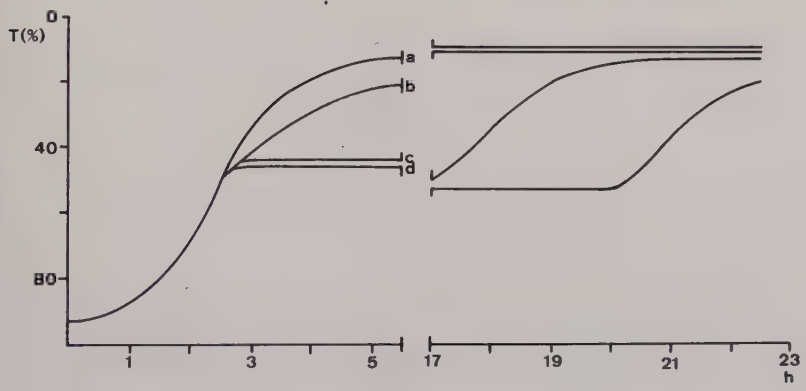


Abb. 20: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Merulidial bei Bacillus brevis im Biophotometer

a: Kontrolle oder 21 µg/ml
b: 43 µg/ml
c: 71 µg/ml
d: 100 µg/ml

8. Einfluß des Merulidials auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vivo

8.1. Einfluß des Merulidials auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vegetativen Zellen von Bacillus brevis bei konstanter Inkubationszeit und verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums

Bei diesem nach II.12. ausgeführten Versuch wurden 10, 20, 40 und 70 µg Merulidial/ml zu den Bakteriensuspensionen gegeben. Nach 40 Minuten wurde der Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen durch Trichloressigsäure gestoppt. Die gemessenen Radioaktivitäten der Proben mit Antibiotikum wurden auf die jeweilige Kontrolle ohne Antibiotikum (= 100 %) bezogen und in Abbildung 21 wiedergegeben.

Ein deutlicher Effekt ist bei 40 µg/ml sichtbar. Bei dieser Konzentration wurden nach der angegebenen Zeit nur noch 12 % Einbau in die DNS erreicht, während in RNS und Protein noch 41 %, beziehungsweise 44 % des Kontrollwertes eingebaut wurden.

8.2. Einfluß des Merulidials auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms

1, 5 und 10 µg Merulidial/ml wurden zu den unter II.13. beschriebenen Ansätzen hinzugefügt. Die einer Einbauzeit von 20 Minuten entsprechenden Radioaktivitäten wurden ebenfalls wie bei III.8.1. in Relation zu den entsprechenden Kontrollwerten (= 100 %) gesetzt und in Abbildung 22 dargestellt.

Bei den im Gegensatz zu den Zellen von Bacillus brevis weitaus empfindlicheren Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms genügte bereits 1 µg Merulidial/ml, um den Einbau von Thymidin in die DNS auf 22 % des Kontrollwertes absinken zu lassen, während der Einbau von Uridin und L-Leucin in die entsprechenden Makromoleküle bei dieser Konzentration noch 88 %, beziehungsweise 98 % betrug.

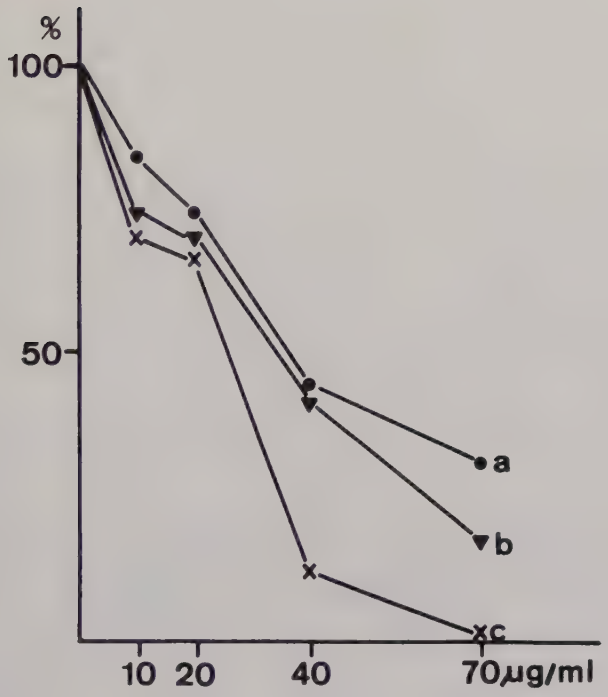


Abb. 21: Wirkung des Merulidials auf die Makromolekülsynthesen in vegetativen Zellen von Bacillus brevis bei verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums

a: Proteinsynthese (100 % ≙ 3632 cpm/ml)
b: RNS-Synthese (100 % ≙ 7840 cpm/ml)
c: DNS-Synthese (100 % ≙ 1296 cpm/ml)

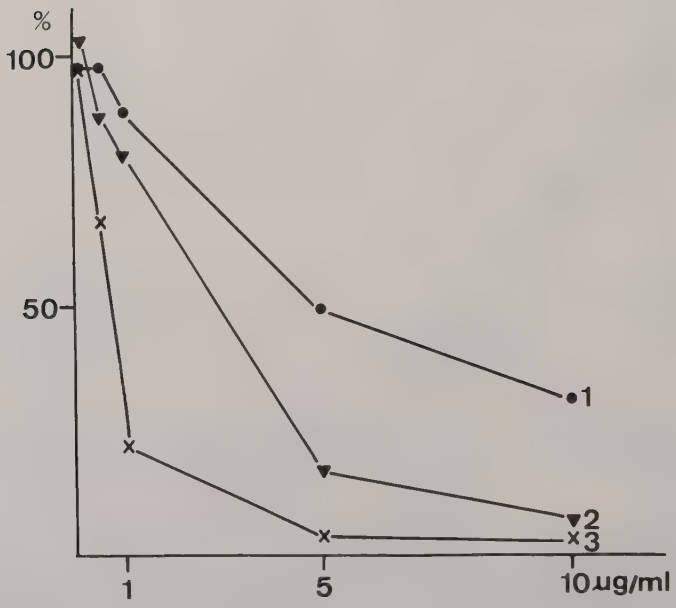


Abb. 22: Wirkung des Merulidials auf die Makromolekülsynthesen des Ehrlich Ascites Carcinoms

1: Proteinsynthese (100 % ≙ 10698 cpm/3 ml)
2: RNS-Synthese (100 % ≙ 8552 cpm/3 ml)
3: DNS-Synthese (100 % ≙ 2430 cpm/3 ml)

9. Prüfung auf Mutagenität (Test nach Ames)

9.1. Nachweis der Mutagenität im Plattendiffusionstest

In die nach II.15.1. hergestellten Platten wurden die vier Histidin-auxotrophen Mutanten von Salmonella typhimurium mit der Oberschicht eingegossen und Filterrondellen mit 5, 10, 50, 100, 250 und 500 µg Merulidial auf die Platten gelegt.

Die Platten mit dem empfindlichen Teststamm TA 100 zeigten nach 48 Stunden bei den Konzentrationen 50, 100, 250 und 500 µg einen entsprechend großen Hemmhof, um den ein gegen den Background sich von spontanen Revertanten deutlich abzeichnender Ring zu sehen war.

Diese in Abbildung 23 dargestellte Anhäufung von Kolonien ist auf Mutationen von Histidin-auxotroph zu Histidin-prototroph zurückzuführen, die durch Merulidial erzeugt wurden.

Bei den anderen Stämmen, Salmonella typhimurium TA 1535, TA 1537 und TA 98 konnte für Merulidial keine mutagene Wirkung festgestellt werden.

9.2. Nachweis der Mutagenität durch Eingießen des Antibiotikums in die Testplatten

Der positive Befund der Mutagenität des Merulidials im Plattendiffusionstest bei Salmonella typhimurium TA 100 war Anlaß dafür, das Antibiotikum bei diesem Stamm auch in die Oberschicht einzugießen und die Anzahl der Mutanten bei verschiedenen Konzentrationen des Merulidials festzustellen.

Dabei wurden bei einer Konzentration von 10 µg/ml Oberschicht 216 durch Merulidial hervorgerufene Revertanten gezählt.

Während bei einer Konzentration von 25 µg/ml die Mutationsrate gleich blieb, sank sie bei höheren Konzentrationen infolge der nun vorherrschenden antibiotischen Wirkung des Merulidials stark ab.

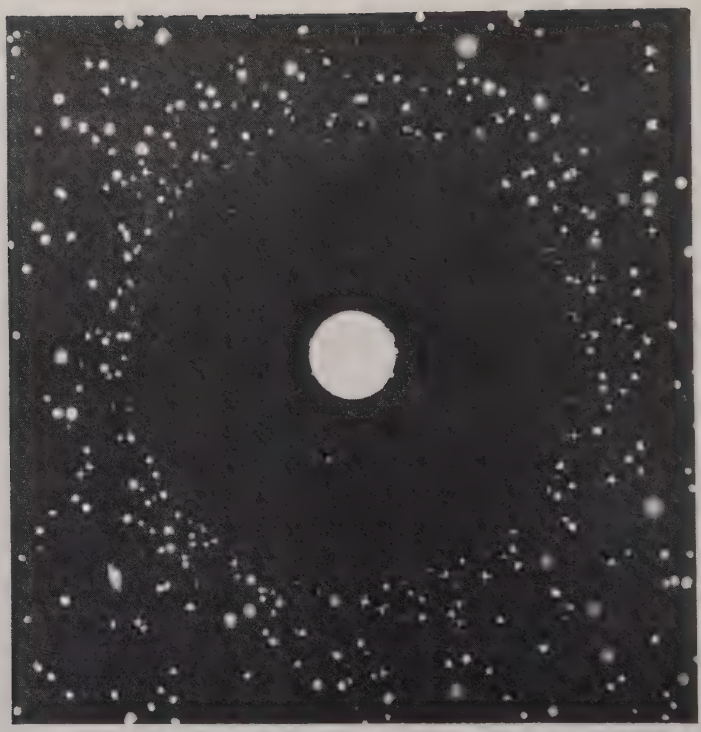


Abb. 23: Durch Merulidial hervorgerufene Revertanten von Salmonella typhimurium, Stamm TA 100.
(Plattendiffusionstest, 500 µg Merulidial)

10. Hämolytische Eigenschaften

Merulidial wirkt nicht hämolysierend. Selbst bei einer Konzentration von 200 µg/ml konnte keine Hämolyse beobachtet werden.

11. Vergleich der antibiotischen Aktivität von Merulidial mit der seines Triol- und Acetylderivates.

Um zu klären, welche Gruppen des Merulidial-Gerüstes essentiell für die antibiotische Wirkung sind, wurden das an der Hydroxylgruppe acetylierte sowie das durch Reduktion der Aldehydgruppen hergestellte Triolderivat auf ihre Wirksamkeit gegen Penicillium notatum, Bacillus brevis und Bacillus subtilis im Plattendiffusionstest untersucht.

In den Tabellen 9 - 11 sind die Hemmhofdurchmesser dieser Substanzen bei den erwähnten Testorganismen wiedergegeben.

Tabelle 9: Vergleich der antibiotischen Aktivität von Merulidial mit der seines Triol- und Acetylderivates bei Penicillium notatum (Plattendiffusionstest).

Substanz	Hemmhofdurchmesser (mm) bei 20 µg/Filterrondelle			
	20	50	100	200
Merulidial	-	-	12	14
Merulidial-Triolderivat	-	-	-	-
Merulidial-Acetylderivat	-	12	23	25

Tabelle 10: Vergleich der antibiotischen Aktivität von Merulidial mit der seines Triol- und Acetylderivates bei Bacillus brevis (Plattendiffusionstest)

Substanz	Hemmhofdurchmesser (mm) bei 20 µg/Filterrondelle	50	100	200
Merulidial	-	9	13	18
Merulidial-Triolderivat	-	-	-	-
Merulidial-Acetylderivat	-	-	10	13

Tabelle 11: Vergleich der antibiotischen Aktivität von Merulidial mit der seines Triol- und Acetylderivates bei Bacillus subtilis (Plattendiffusionstest)

Substanz	Hemmhofdurchmesser (mm) bei 20 µg/Filterrondelle	50	100	200
Merulidial	-	9	11	16
Merulidial-Triolderivat	-	-	-	8
Merulidial-Acetylderivat	-	8	10	14

Nach diesen Untersuchungen hat das Triolderivat von Merulidial keine antibiotische Wirkung. Die geringe Aktivität gegen Bacillus sub-

tilis ist wahrscheinlich noch auf eine 5 %ige Verunreinigung mit dem Ausgangsprodukt zurückzuführen (Giannetti, 1977).

Interessant ist jedoch die Verschiebung der Wirkungsintensität des Merulidial-Acetylderivates. Während die Wirkung gegen Bacillus subtilis und Bacillus brevis abgeschwächt ist, erhöhte sich die Wirksamkeit gegen Penicillium notatum deutlich.

IV. Diskussion

A. Merulinsäure A, B und C

Um nachzuprüfen, ob das in Submerskultur von Merulius tremellosus Fr. gebildete Antibiotikum auch in Fruchtkörpern der gleichen Art enthalten ist, wurden lyophilisierte Karpophore mit einem Methanol-Aceton-Gemisch extrahiert und nach Reinigung des Extraktes ein farbloses, kristallines Antibiotikum gewonnen.

Dieses Antibiotikum -Merulinsäure A- stimmte in seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften jedoch in keiner Weise mit dem fermentativ gebildeten Merulidial überein.

Dahingegen zeigten physikalisch-chemische (UV- und IR-Spektren, chromatographisches Verhalten) und biologische Eigenschaften (Wirkungsspektren) der aus Fruchtkörpern von Phlebia radiata Fr. isolierten Antibiotika, daß zwischen diesen und Merulinsäure A große Ähnlichkeit, beziehungsweise Identität vorlag. Die Strukturaufklärung dieser drei Substanzen -Merulinsäure A, B und C- durch Giannetti und Steglich (Giannetti, 1978) bestätigte schließlich deren chemische Zusammengehörigkeit.

Während die Reinigung von Merulinsäure A und C durch Adsorptionschromatographie an Kieselgel und durch das Molekularsieb Sephadex LH-20 mühelos war, gestaltete sich die Isolierung von Merulinsäure B schwieriger. Trotz des gleichen Molekulargewichtes wie Merulin-

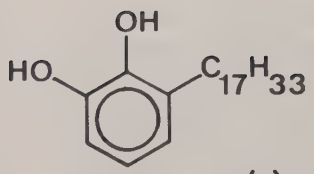
säure A wurde Merulinsäure B bei der Chromatographie an Sephadex LH-20 stets zusammen mit anderen Stoffen eluiert (Ve/Vt-Wert kleiner als bei Merulinsäure A), was wahrscheinlich auf unterschiedliche Adsorption der Merulinsäure B an das Dextrangel zurückzuführen war.

Die UV-Spektren von Merulinsäure B und C sind in allen drei Lösungsmitteln nahezu gleich (siehe auch Tabelle 3 und Abbildungen 1 - 3). Vergleiche von Merulinsäure A auf der einen und Merulinsäure B und C auf der anderen Seite ergeben jedoch auffällige Unterschiede. So weist die Hauptbande von Merulinsäure A in Methanol (259 nm) und in salzsaurem Methanol (262 nm) im Gegensatz zu den entsprechenden Banden von Merulinsäure B und C (243,bzw. 244 nm) infolge der zusätzlichen phenolischen Hydroxylgruppe eine deutliche Rotverschiebung auf (Williams et Fleming, 1975). Im alkalischen Methanol ist bei allen drei Merulinsäuren die Hauptbande nur noch als schwache Schulter zu sehen. Merulinsäure A unterscheidet sich aber auch in diesem Lösungsmittel von Merulinsäure B und C insofern, als sie darin bei 272 nm ein neues Absorptionsmaximum aufweist.

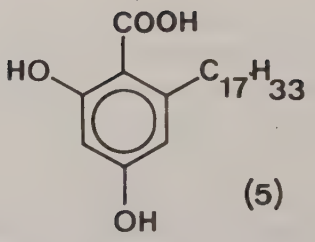
Auch in den IR-Spektren zeigen Merulinsäure B und C weitgehend Übereinstimmung, während sich Merulinsäure A sowohl im Bereich der funktionellen Gruppen als auch in der 'fingerprint'-Region deutlich von den erstgenannten unterscheidet.

Die von Giannetti und Steglich ermittelten Strukturen der Merulinsäuren weisen als Grundgerüst eine 6-Oleylsalicylsäure (6-(8-Heptadecenyl)-2-hydroxybenzoesäure, ≙ Merulinsäure C) auf. Diese Struktur ist bei Merulinsäure A um eine zur Carboxylgruppe p-ständige Hydroxylgruppe und bei Merulinsäure B um eine an C-16 der Seitenkette stehende Hydroxylgruppe erweitert.

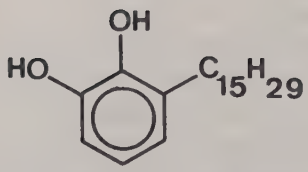
Naturstoffe dieses Typs finden sich jedoch nicht nur bei den hier genannten Pilzen, sondern auch bei zwei verschiedenen Gruppen der Spermatophyta: Bei Arten der Anacardiaceae L. und bei Ginkgo biloba L. In Abbildung 24 sind neben Merulinsäure A (5), B (6) und C (7) einige dieser Verbindungen wiedergegeben. Von den Brenzcate-



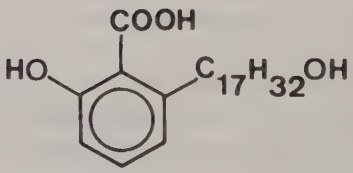
(1)



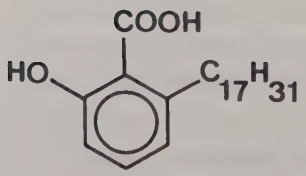
(5)



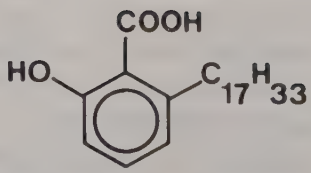
(2)



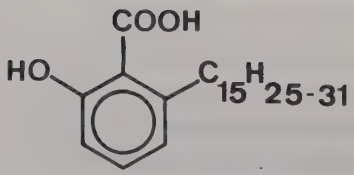
(6)



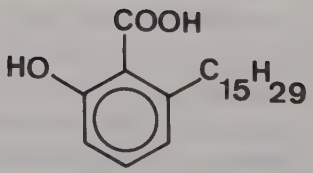
(3)



(7)



(4)



(8)

Abb. 24 (Erklärungen s. Text)

chinderivaten Glutarenghol (1) aus Gluta renghas L. (Backer et Haack, 1941 a) und den Urushiolen aus Rhus vernicifera D.C. und Rhus toxicodendron L. sei besonders auf die letztgenannten eingegangen. Die Urushiole stellen ein Gemisch gesättigter, mono (= Urushenol (2))-, di- und triolefinischer Komponenten dar (Symes et Dawson, 1954; Sunthankar et Dawson, 1954), das einerseits der Hauptbestandteil des noch heute zur Lackherstellung benutzten Latex aus Rhus vernicifera ist (Hegnauer, 1964), andererseits aber auch die gefürchtete Rhus-Dermatitis hervorruft (Landsteiner, 1939; Loev et Dawson, 1959).

Strukturell noch näher verwandt mit den Merulinsäuren sind die Salicylsäurederivate Pelandjausäure (3) aus Pentaspodon motleyi Hook.f. (Backer et Haack, 1941 c) und aus Pentaspodon officinalis Holmes (Lamberton, 1959) und die Anacardsäure (4) aus den Samenschalen von Anacardium occidentale L. (Backer et Haack, 1949 b), die nach Dawson (1954) jedoch ein Gemisch gesättigter, mono-, di- und triolefinischer Derivate ist. Besonders das der Merulinsäure C (3) sehr ähnliche Monoolefin der Anacardsäure sei hier hervorgehoben, da es mit der schleimhautreizenden Ginkgolsäure (8) identisch ist, die aus der Sarkotesta von Ginkgo biloba isoliert (Kawamura, 1928) und deren Struktur von Furukawa (1934; 1935) aufgeklärt wurde.

Bis auf Proteus vulgaris, welches gegen Merulinsäure A und B sensitiv ist, werden die getesteten Gram-negativen Bakterien von den Merulinsäuren nicht gehemmt. Von den Gram-positiven Bakterien zeigen nur Staphylococcus aureus gegen Merulinsäure C und Mycobacterium phlei gegen Merulinsäure A bei den verwendeten Konzentrationen eine natürliche Resistenz, während die übrigen Bakterienstämme gegen alle drei Antibiotika sensitiv sind.

Der bereits bei den physikalisch-chemischen Eigenschaften festgestellte Unterschied zwischen Merulinsäure A und Merulinsäure B und C beruht auf einer Hydroxylgruppe. Die Verschiedenheit der Sensibilität von Mycobacterium phlei gegen Merulinsäure A einerseits und gegen Merulinsäure B und C andererseits, scheint ebenfalls an dem Vorhandensein der zusätzlichen phenolischen Hydroxylgruppe zu lie-

gen. Als Ursache kann man vermuten, daß Merulinsäure A in die Zellwand von Mycobacterium phlei mit ihrem hohen Gehalt an Wachsen schlechter einzudringen vermag als die lipophileren Merulinsäuren B und C. Die alkoholische Hydroxylgruppe von Merulinsäure B ist in diesem Zusammenhang wohl nicht von Bedeutung.

Antibiotische Aktivität wurde auch für das Natriumsalz der diolefinischen Anacardsäure (4) nachgewiesen. Da diese Substanz der Merulinsäure C (3) strukturell sehr nahe steht, soll darauf näher eingegangen werden.
Die von Eichbaum (1946 a) ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen von Natriumanacardat betragen für Streptococcus pyogenes 5 µg/ml und für Neisseria gonorrhoeae , Staphylococcus aureus und Mycobacterium tuberculosis 50 µg/ml. Sowohl Gram-negative Bakterien wie Escherichia coli, Pseudomonas pyocyaneus und Salmonella typhi als auch Pilze wie Penicillium notatum, Aspergillus niger und Hefen sind gegenüber dieser Substanz nicht sensitiv.

Während örtliche Instillationen von 0,2 - 0,5 %igen Natriumanacardatlösungen bei penicillinresistenter Urethritis des Menschen zu positiven Ergebnissen führten, ergaben intraperitoneale und intravenöse Injektionen bei Versuchstieren, daß sich eine parenterale Verabreichung dieses Antibiotikums wegen zu hoher Toxizität verbietet (Eichbaum, 1946 c). Schließlich sei noch die bemerkenswerte anthelminthische Aktivität dieser Substanz erwähnt. So wurde der Nematode Rhabditis fuelleborn bei einer Konzentration von 10 µg/ml innerhalb von 30 Minuten getötet (Eichbaum, 1946 b). Nach Chattopadhyaya und Khare (1969) ist die vermicide Wirkung des Anacardates gleichzusetzen mit der des Piperazins.

Auf Grund der gleich starken Hemmung der Makromolekülsynthesen durch die Merulinsäuren wurde nach einem anderen primären Wirkort gesucht. Da bereits die Strukturformeln einen tensidähnlichen Effekt vermuten ließen, wurden die Merulinsäuren auf hämolytische Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse (Abbildung 14) lassen den Schluß zu, daß die antibiotische Aktivität der Merulinsäuren wahrscheinlich

durch eine oberflächenaktive Wirkung auf Cytoplasmamembran oder Zellwandbestandteile bedingt ist. Aus Abbildung 14 ist ferner zu erkennen, daß sich Merulinsäure A auch in der Wirkungsintensität von Merulinsäure B und C unterscheidet, eine Erscheinung, die offensichtlich wieder auf die zweite phenolische Hydroxylgruppe zurückzuführen ist.

Auch bei Alkalisalzen der Ginkgolsäure (8) (Kawamura, 1928) und der Anacardsäuren (4) (Eichbaum, 1946 c) wurden hämolytische Eigenschaften nachgewiesen. Eichbaum (1946 c) stellte weiterhin fest, daß Natriumanacardat in 0,1 %iger Lösung die spezifische Agglutination von 'typhoiden' Bakterien durch antikörperhaltiges Serum verhindert; er führte diesen Effekt ebenfalls auf die oberflächenaktive Wirkung dieses Antibiotikums zurück.

Daß die antibiotische Eigenschaft der Merulinsäuren auf einem detergentienartigen Angriff beruht, wird schließlich auch dadurch belegt, daß nach Methylierung der Hydroxylgruppen das Antibiotikum seine Wirkung nun infolge des fehlenden hydrophilen 'Kopfes' verloren hat.

Ebenfalls strukturelle Ähnlichkeit mit den Merulinsäuren weist das von Hirata und Nakanishi (1949) aus Albatrellus confluens (Alb. et Schw. per Fr.) Kotl. et Pouz. (= Grifola confluens) isolierte Grifolin auf, dessen Struktur (Abbildung 25) von Goto et al. (1963) aufgeklärt wurde.

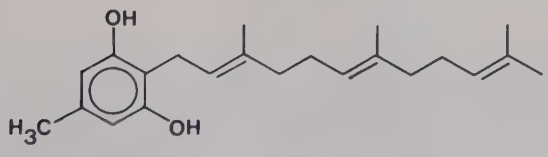


Abb. 25: Grifolin

Grifolin wirkt nur gegen Gram-positive Bakterien und ist wie Merulinsäure B und C besonders gegen Mycobakterien aktiv. Der Angriffsort dieses Antibiotikums wurde noch nicht untersucht. Jedoch ist eine den Merulinsäuren gleichende Wirkungsweise nicht auszuschließen. Es sei noch hinzugefügt, daß von Besl et al. (1977) zwei weitere Farnesylphenole , das Scutigeral und das Neogrifolin aus Albatrellus ovinus (Schiff. per Fr.) Kotl. et Pouz. und aus Albatrellus subrubescens (Murr.) Pouz. isoliert wurden. Ob diese neuen Substanzen, von denen das Neogrifolin auch in Albatrellus confluens nachgewiesen wurde (Besl et al., 1977), antibiotische Aktivität zeigen, ist noch nicht bekannt.

B. M e r u l i d i a l

Die im Screening bei mehreren Stämmen des Basidiomyceten Merulius tremellosus Fr. gefundene antibiotische Aktivität war nur im Kulturfiltrat nachzuweisen und konnte daraus mit Äthylacetat extrahiert werden.

Im Gegensatz zu den Merulinsäuren war die Reinigung dieses neuen Sesquiterpenantibiotikums -Merulidial- weitaus problematischer. Besonders polare Lösungsmittel und längeres Verbleiben an Kieselgel förderte den Zerfall des Merulidials. Aus diesem Grund war auch eine Chromatographie über Sephadex LH-20 mit Methanol nicht möglich, und bei der Reinigung über Kieselgel mußte auf eine schnelle Elution und eine relativ kurze Säule geachtet werden.

Die Identifizierung von Merulidial auf Dünnschichtchromatographieplatten mit 50 %iger Phosphorsäure und mit Antimon-(III)-chlorid (Carr-Price-Reagenz) ließ bereits auf einen Terpenkörper schließen. Weiterhin gab das sonst nur für reduzierende Zucker verwendete Anilinphthalat Hinweise auf Aldehydgruppen.

Die von Giannetti und Steglich (Giannetti, 1978) aufgeklärte Struktur des Merulidials zeigt einen Sesquiterpendialdehyd (Abbildung 18). Stoffe mit ähnlichem Sesquiterpengerüst, wie das des Merulidials, finden sich auch bei anderen Gruppen der Basidiomyceten.

Erwähnt seien an dieser Stelle die Illudine M und S, die von Anchel et al. (1950) aus Omphalotus olearius (DC. ex Fr.) Sing. (≙ Clitocybe illudens) isoliert und deren Strukturen von Mc Morris und Anchel (1965) aufgeklärt wurden. Von diesen beiden Substanzen ist das Illudin S antibakteriell und antifungisch aktiv (Anchel et al., 1950).

Marasminsäure, die von Kavanagh et al. (1949) aus Marasmius conigenus isoliert wurde, stellt einen gegen Bakterien und Pilze wirksamen Sesquiterpenlactonaldehyd dar. Die Struktur wurde 1966 von Dugan et al. ermittelt.

Auch Lactarorufin A und B (Daniewski et Kocor, 1970) und Isolactarorufin (Daniewski et al., 1976) sind Sesquiterpenlactone. Sie wurden aus Fruchtkörpern von Lactarius rufus (Scop.) Fr. isoliert. Ob sie antibiotisch aktiv sind, ist noch nicht untersucht.

Aus Lactarius vellereus (Fr.) Fr. und Lactarius pergamenus (Swartz ex Fr.) Fr. wurden neben einem Sesquiterpenlacton (Magnusson et Thoren, 1973 a; 1973 b) zwei Sesquiterpenaldehyde -das Velleral und das Isovelleral- isoliert, die die scharfschmeckenden Komponeneten dieser Pilze darstellen sollen (List et Hackenberg, 1969). Die Strukturaufklärung dieser Substanzen gelang Magnusson et al. (Isovelleral: Magnusson et al., 1972; Velleral: Magnusson et al., 1973). Besonders das in Abbildung 26 dargestellte Isovelleral zeigt große strukturelle Übereinstimmung mit Merulidial.

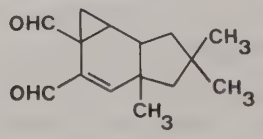


Abb. 26: Isovelleral

Über eine antibiotische Wirksamkeit dieser Verbindung wurde noch nichts berichtet.
Acetonextrakte aus Fruchtkörpern von Lactarius vellereus (Fr.) Fr. var. velutinus Bert. -gesammelt in Laubwäldern des Schönbuchs bei Tübingen- zeigten jedoch im Plattendiffusionstest gegen Bacillus subtilis und Penicillium notatum starke antibiotische Aktivität. Verglichen mit den bei List und Hackenberg (1969) angegebenen chromatographischen Eigenschaften von Velleral und Isovelleral

ergeben Bioautographie und Anfärbung der Dünnschichtchromatogramme des Aceton-Extraktes, daß die antibiotische Aktivität wahrscheinlich auf Velleral und Isovelleral zurückzuführen ist.

Die antibakterielle Aktivität von Merulidial (Tabelle 7) richtet sich wie bei den Merulinsäuren fast ausschließlich gegen Gram-positive Organismen; allerdings sind zu deren Hemmung relativ hohe Konzentrationen erforderlich.
Beachtlich ist die antifungische Wirkung des Merulidials auf Vertreter mehrerer Pilzklassen und die Antitumorwirkung gegen Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms der Maus (Abbildung 22). Dieses breite Wirkungsspektrum von Merulidial, das Pro- und Eukaryonten beinhaltet, läßt bereits eine gewisse Toxizität vermuten.

Von den drei Makromolekülsynthesen hemmt Merulidial sowohl bei Bacillus brevis-Zellen als auch bei Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms bevorzugt die DNS-Synthese.
Walser und Heinstein (1972) untersuchten die Wirkungsweise des die DNS-Synthese hemmenden Illudin S in Bacillus subtilis-Zellen und in Bacillus subtilis-Sphaeroplasten. Dabei stellte sich heraus, daß Illudin S den Transport von Thymidin in die Zellen nicht beeinflußt, und daß es die DNS-Synthese nur hemmte, wenn Thymidin, nicht aber wenn TMP, TDP oder TTP als Vorstufe angeboten wurde. Auch die Umwandlung von Thymidin in TMP, TDP oder TTP wurde bei Versuchen mit zellfreiem Material nicht gehemmt.
Auf Grund dieser Ergebnisse postulieren die Autoren ein zweites DNS-synthetisierendes System, bei welchem Thymidin über eine noch unbekannte Vorstufe in die DNS eingebaut wird.

Ob Merulidial auch einen derartigen Effekt wie das Sesquiterpenantibiotikum Illudin S ausübt, kann den vorliegenden Einbauversuchen nicht entnommen werden. Die Ergebnisse des Mutagenitätstests sprechen allerdings dagegen. Denn die Tatsache, daß Merulidial bei Salmonella typhimurium, Mutante TA 100, Punktmutationen auslöst, deutet auf eine direkte Reaktion des Antibiotikums mit der DNS-Matrize, was für Illudin S nach den geschilderten Ergebnissen nicht zutrifft.

Die antibiotische Wirkung ist auf Seiten des Merulidials wahrscheinlich auf die beiden reaktionsfähigen Aldehydgruppen zurückzuführen. Den Tabellen 9 - 11 ist zu entnehmen, daß nach Reduktion der Aldehyd- zu Alkoholgruppen die Wirkung des Merulidials gegen Bacillus brevis, Bacillus subtilis und Penicillium notatum aufgehoben ist. Daher können diese funktionellen Gruppen für die antibiotische Aktivität als essentiell angesehen werden.

Neben dem bereits erwähnten Antibiotikum Marasminsäure und dem Velleral und Isovelleral, die ebenfalls Aldehydgruppen tragen, sei an dieser Stelle noch das aus Kulturlösungen von Botrytis cinerea isolierte Antibiotikum Botrydial genannt (Schönbeck, 1968; Fehlhaber et al., 1974). Dieses Sesquiterpenantibiotikum weist ebenfalls zwei Aldehydgruppen auf und ist sowohl gegen Bakterien als auch gegn Pilze aktiv. Auch bei Botrydial scheint die Wirkung auf den beiden Aldehydgruppen zu beruhen, da das Dihydroderivat, welches ebenfalls aus Kulturlösungen dieses Pilzes isoliert wurde, keine antibiotische Aktivität mehr aufweist.

Die erstaunliche Wirkungssteigerung des Merulidial-Acetylderivates -im Vergleich zum Merulidial- kann derzeit noch nicht erklärt werden. Vielleicht ist sie aber auf die erhöhte Lipophilität des Antibiotikums zurückzuführen, die dessen Eindringen in Zellen von Penicillium notatum, nicht aber von Bacillus brevis oder Bacillus subtilis, erleichtert.

C. Chemotaxonomische Aspekte

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen neuen Metabolite aus Merulius tremellosus Fr. und Phlebia radiata Fr. lassen eine chemotaxonomische Wertung im Sinne einer für eine bestimmte Organismengruppe charakteristischen Stoffklasse nicht zu.
Ein wichtiger Grund hierfür ist die viel zu geringe Anzahl untersuchter Arten, was vor allem für die verfügbaren Fruchtkörper gilt. So waren in ausreichender Menge neben den Fruchtkörpern von Merulius tremellosus und Phlebia radiata nur die von Plicatura crispa (Fr.) Rea und Panellus serotinus (Pers. ex Fr.) Kühn. verfügbar.

Diese Fruchtkörper wurden ebenfalls, wie bei II.9. beschrieben, aufgearbeitet. Antibiotische Aktivität und somit eine der Merulinsäuren konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.
Im Falle von Plicatura crispa steht dies in Einklang mit der Meinung von Ginns (1970), der Plicatura nivea (Fr.) Karst. (≙ Merulius niveus Fr.) und Plicatura crispa (≙ Merulius crispus Pers.) auf Grund unterschiedlicher Merkmale des Basidiokarps aus dem Genus Merulius ausschließt.

Das Vorkommen von Merulinsäure A sowohl bei Merulius tremellosus als auch bei Phlebia radiata unterstreicht die Feststellung vieler Autoren (u.a.: Donk, 1964; Ginns, 1976), daß diese beiden Arten infolge gemeinsamer anatomischer Strukturen nahe verwandt sind.

Das Vorhandensein der Merulinsäuren bei Merulius tremellosus und Phlebia radiata ist ein Beispiel dafür, daß das Vorkommen ähnlicher oder identischer Sekundärmetabolite als eine Ergänzung zu bereits bekannten Merkmalen bei noch nicht restlos geklärten verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb kleiner Gruppen dienen kann.

Daß chemische Merkmale nicht zu überschätzen sind und nicht zu einer minderen Bewertung anderer Charakteristika führen dürfen, wird am Beispiel des Merulidials deutlich.
Merulidial wurde unter den getesteten Pilzen nur bei Merulius tre-

mellosus, und dort auch nur in Submerskultur, gefunden. Bei Phlebia radiata, Stamm WQ 516, war es selbst durch Fermentation (vgl. II.5.2.2.) und der damit möglichen Konzentration der Proben auf das 25fache (vgl. III.C.1.) nicht nachweisbar.
Dahingegen finden sich recht ähnliche Verbindungen, wie die Sesquiterpenaldehyde Velleral und Isovelleral und verschiedene Sesquiterpenlactone,bei mehreren Arten der Gattung Lactarius (DC ex Fr.) S.F. Gray, ohne daß eine nähere Verwandtschaft zu Merulius tremellosus bestünde.

In Submerskultur konnten die Merulinsäuren weder bei Merulius tremellosus noch bei Phlebia radiata nachgewiesen werden.

Dieses von den Kulturbedingungen stark abhängige Vorkommen sekundärer Stoffwechselprodukte, wie es am Beispiel der Merulinsäuren und des Merulidials gezeigt wurde, ist wohl für ihre Verwendung in der Chemotaxonomie eines der größten Hindernisse.

V. Zusammenfassung

Aus Fruchtkörpern von Merulius tremellosus Fr. und Phlebia radiata Fr. wurden drei neue Antibiotika -Merulinsäure A, B und C (6-Oleylsalicylsäurederivate)- isoliert. Während Merulinsäure B und C nur bei Phlebia radiata gefunden wurde, war Merulinsäure A in Fruchtkörpern beider Arten enthalten.
Bei Raumtemperatur sind Merulinsäure A und C farblose, kristalline Substanzen, während Merulinsäure B ein farbloses Öl darstellt.
Die Strukturen der Merulinsäuren (Giannetti, 1978) werden dargestellt.

Das Wirkungsspektrum der Merulinsäuren erstreckt sich auf Gram-positive und zum Teil auf Gram-negative Bakterien.

Die Merulinsäuren hemmen die Makromolekülsynthesen in Bacillus brevis-Zellen in gleichem Ausmaß. Die bereits auf Grund ihrer Struktur vermutete tensidartige Wirkung wurde durch Hämolysetests bestätigt.

Wie zu erwarten, war das Trimethylderivat von Merulinsäure A wegen des fehlenden hydrophilen Anteils nicht antibiotisch aktiv.

Die Merulinsäuren wurden mit ähnlichen Stoffen, wie die Urushiole und die Anacardsäuren, die sich bei den Anacardiaceae L. und bei Ginkgo biloba L. finden, in bezug auf die Struktur und die biologischen Eigenschaften verglichen.

In Fruchtkörpern von Panellus serotinus (Pers. ex Fr.) Kühn. und Plicatura crispa (Fr.) Rea konnte keine der Merulinsäuren nachgewiesen werden.

Das Vorkommen von Merulinsäure A sowohl bei Merulius tremellosus als auch bei Phlebia radiata unterstützt die bereits durch gemeinsame anatomische Merkmale erkennbare nahe Verwandtschaft dieser beiden Arten.

Aus Kulturen von Merulius tremellosus, Stamm WQ 568, wurde das Sesquiterpenantibiotikum Merulidial (Strukturaufklärung s. Giannetti, 1978) als farblose, kristalline Substanz erhalten.

Bei den insgesamt 31 Stämmen (= 26 Arten), die auf Grund morphologisch-anatomischer Gemeinsamkeiten mit Merulius tremellosus einem Screening unterworfen wurden, konnte Merulidial jedoch nur in der Submerskultur von Merulius tremellosus nachgewiesen werden.

Das Wirkungsspektrum von Merulidial erstreckt sich auf Gram-positive und zum Teil Gram-negative Bakterien und auf eine Vielzahl von Pilzen.

Sowohl bei Bacillus brevis-Zellen als auch bei Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms der Maus wird die DNS-Synthese bevorzugt gehemmt. Diese spezifische Wirkung auf die DNS steht in Einklang mit der nach Ames et al. (1975) festgestellten Eigenschaft des Merulidials, bei einer Histidin-auxotrophen Mutante von Salmonella typhimurium Mutationen hervorzurufen.

Als essentiell für die Wirkung des Merulidials wurden die beiden reaktionsfähigen Aldehydgruppen ermittelt, da die entsprechende reduzierte Verbindung , das Triolderivat, nicht mehr aktiv ist. Ungeklärt ist zur Zeit noch die antifungische Wirkungssteigerung des an der Hydroxylgruppe acetylierten Merulidials.

Andere, dem Merulidial ähnliche Sesquiterpen-Metabolite bei Basidio- und Ascomyceten werden vorgestellt.

VI. Literaturverzeichnis

Ames, B.N., J. Mc Cann and E. Yamasaki: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test.
Mutat. Res. 31, 347 - 364 (1975)

Anchel, M., M.A. Hervey and W.J.Robbins: Antibiotic substances from Basidiomycetes. VII. Clitocybe illudens.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 36, 300 - 305 (1950)

Backer, H.J. et N.H. Haack: Le principe toxique du Gluta renghas L.
Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas 60, 656 - 660 (1941 a)

--- Composants du latex de l'Anacardium occidentale L.
Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas 60, 661 - 677 (1941 b)

--- La structure de l'acide pélandjauique.
Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas 60, 678 - 688 (1941 c)

Berdy, J.: Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure.
Adv. Appl. Microbiol. 18, 309 - 406 (1974)

Besl, H., G. Höfle, B. Jendrny, E. Jägers und W. Steglich: Pilzpigmente XXXI: Farnesylphenole aus Albatrellus-Arten (Basidiomycetes).
Chem. Ber. 110, 3770 - 3776 (1977)

Chattopadhyaya, M.K. and R.L. Khare: Isolation of anacardic acid from Semicarpus anacardium L. and study of its anthelmintic activity.
Indian J. Pharm. 31, 104 - 105 (1969)

Christiansen, M.P.: Danish resupinate fungi.
Dan.Bot. Ark. 19, 63 - 388 (1960)

Corner, E.J.H.: Merulioid fungi in Malaysia.
Gard. Bull. (Singapore) 25, 355 - 381 (1971)

Coultas, M.K. and D.J. Hutchison: Metabolism of resistant mutants of Streptococcus faecalis. IV. Use of a biophotometer in growth-curve studies.
J. Bacteriol. 84, 393 - 401 (1962)

Cunningham, G.H.: The Thelephoraceae of Australia and New Zealand.
New Zealand Dept. Sci. Ind. Res. Bull. 145, 1 - 359 (1963)

Daniewski, W.M. and M. Kocor: Isolation and structure of some new sesquiterpenes from Lactarius rufus.
Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim. 18, 585 - 593 (1970)

Daniewski, W.M., M. Kocor and S. Thoren: Constituents of higher fungi. Part VIII (1). Isolactarorufin, a novel tetracyclic sesquiterpene lactone from Lactarius rufus.
Heterocycles 5, 77 - 84 (1976)

Donk, M.A.: Notes on resupinate Hymenomycetes. IV.
Fungus 27, 1 - 29 (1957)

--- A conspectus of the families of Aphyllophorales
Persoonia 3, 199 - 324 (1964)

Dugan, J.J., P. de Mayo, M. Nisbet, J.R. Robinson and M. Anchel: Terpenoids. XIV. The constitution and biogenesis of marasmic acid.
J. Am. Chem. Soc. 88, 2838 - 2844 (1966)

Eichbaum, F.W.: Biological properties of anacardic acid (o-pentadecadienylsalicylic acid) and related compounds.
Part I: General discussion - bactericidal action.
Mem. Inst. Butantan 19, 71 - 95 (1946 a)

--- Biological properties of anacardic acid (o-pentadecadienylsalicylic acid) and related compounds. Part IV: The vermicidal, antiprotozoic and lavicidal action of anacardates.
Mem. Inst. Butantan 19, 119 - 126 (1946 b)

--- Biological properties of anacardic acid (o-pentadecadienylsalicylic acid) and related compounds. Part V: Toxicology of anacardic acid and related compounds, clinical outlook.
Mem. Inst. Butantan 19, 127 - 133 (1946 c)

Eriksson, J.: Studies in the Heterobasidiomycetes and Homobasidiomycetes-Aphyllophorales of Muddus National Park in North Sweden.
Symb. Bot. Ups. 16, 1 - 172 (1958)

Eriksson, J. and L. Ryvarden: The Corticiaceae of North Europe.
Vol. 2, 59 - 261, Fungiflora, Oslo (1973)

--- The Corticiaceae of North Europe.
Vol. 4, 549 - 886, Fungiflora, Oslo (1976)

Fehlhaber, H.W., R. Geipel, H-J. Mercker, R. Tschesche, K. Welmar und F. Schönbeck: Botrydial, ein Sesquiterpenantibiotikum von Botrytis cinerea.
Chem. Ber. 107, 1720 - 1730 (1974)

Florey, H.W., E. Chain, N.G. Heatley, M.A. Jennings, A.G. Sanders, E.P. Abraham and M.E. Florey: Antibiotics.
Vol 1, 248 - 272, Oxford University Press, London (1949)

Furukawa, S.: Studies in the constituents of Ginkgo biloba L. fruits. Part I.
Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokyo) 24, 304 - 313 (1934)

--- Studies in the constituents of Ginkgo biloba L. fruits. Part IV.
Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokyo) 26, 178 - 185 (1935)

Giannetti, B.M.: Persönliche Mitteilung (1977)

--- Strukturaufklärung neuer antibiotisch wirksamer Metabolite aus den Baumpilzen Merulius tremellosus Fr. und Phlebia radiata Fr., Diplomarbeit, Universität Bonn (1978)

Giannetti, B.M. und W. Steglich: Persönliche Mitteilung (1977)

Ginns, J.H.: Taxonomy of Plicatura nivea (Aphyllophorales).
Can. J. Bot. 48, 1039 - 1043 (1970)

--- Merulius s.s. and s.l., taxonomic disposition and identification of species.
Can. J. Bot. 54, 100 - 167 (1976)

Goto, T., H. Kakisawa and Y. Hirata: The structure of grifolin, an antibiotic from a Basidiomycete.
Tetrahedron 19, 2079 - 2083 (1963)

Harmsen, L.: De danske Merulius-arter.
Bot. Tidsskr. 50, 146 - 162 (1954)

Hegnauer, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen.
Bd. III, 90 - 115, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1964)

Hervey, A.H.: A survey of 500 Basidiomycetes for antibacterial activity.
Bull. Torrey Bot. Club 74, 476 - 503 (1947)

Hirata, Y. and K. Nakanishi: Grifolin, an antibiotic from a Basidiomycete.
J. Biol. Chem. 184, 135 - 143 (1949)

Hütter, R., W. Keller-Schierlein, J. Nüesch und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung: Scopamycine.
Arch. Mikrobiol. 51, 1 - 8 (1965)

Kavanagh, F.: Analytical microbiology.
Academic Press, New York and London (1963)

Kavanagh, F., A. Hervey and W.J. Robbins: Antibiotic substances from Basidiomycetes. IV. Marasmius conigenus.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 35, 343 - 349 (1949)

Kawamura, J.: Überdie chemischen Bestandteile der Frucht von Ginkgo biloba L.
Chem. Centr. 2, 2255 - 2256 (1928)

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation, Universität Tübingen (1971)

Lamberton, J.A.: Further investigations of the exsudates from Pentaspodon officinalis Holmes.
Austral. J. Chem. 12, 234 - 239 (1959)

Landsteiner, K. and M.W. Chase: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. VI. Experiments on the sensitization of guinea pigs to poison ivy.
J. Exp. Med. 69, 767 - 784 (1939)

Lange, M. and L. Hansen: The phylogenetic position of Agaricales
Bot.Tidsskr. 51, 185 - 194 (1954)

List, P.H. und H. Hackenberg: Velleral und iso-Velleral, scharf schmeckende Stoffe aus Lactarius vellereus Fr. 17. Mitteilung über Pilzinhaltsstoffe. Arch. Pharmaz. 302, 125 - 143 (1969)

Loev, B. and Ch.R.J. Dawson: Synthesis of urushenol, the monoolefinic component of the allergenic principles of poison ivy and Japanese lac. J.Org. Chem. 24, 980 - 985 (1959)

Magnusson, G. and S. Thoren: Fungal extractives III. Two sesquiterpene lactones from Lactarius. Acta Chem. Scand. 27, 1573 - 1578 (1973 a)

--- Fungal extractives V. The stereostructure of two sesquiterpene lactones from Lactarius. Acta Chem. Scand. 27, 2396 - 2398 (1973 b)

Magnusson, G., S. Thoren and B. Wickberg: Fungal extractives I. Structure of a sesquiterpene dialdehyde from Lactarius by computer simulation of the NMR spectrum. Tetrahedron Letters 12, 1105 - 1108 (1972)

Magnusson, G., S. Thoren and T. Drakenberg: Fungal extractives IV. Structure of a novel sesquiterpene dialdehyde from Lactarius by spectroscopic methods. Tetrahedron 29, 1621 - 1624 (1973)

Martin, E.M., J. Malec, S. Sved and T.S. Work: Studies on protein and nucleic acid metabolism in virus-infected mammalian cells. 1. Encephalomyocarditis virus in Krebs II mouse-ascites tumor cells. Biochem. J. 80, 585 - 597 (1961)

Mc Morris, T.C. and M. Anchel: Fungal metabolites . The structures of the novel sesquiterpenoids illudin S- and M. J.Am. Chem. Soc. 87, 1594 - 1600 (1965)

Merck: Klinisches Labor, 8 - 11, 12. Auflage (1974)

Oberwinkler, F.: Die Gattungen der Basidiolichenen
Dtsch. Bot. Ges. Neue Folge 4, 139 - 169 (1970)

Raistrick, H. and P. Rudman: Studies in the biochemistry of micro-organisms. 97. Flavipin, a crystalline metabolite of Aspergillus flavipes (Bainier a. Sartory) Thom Church and Aspergillus terreus Thom.
Biochem. J. 63, 395 - 405 (1956)

Robbins, W.J., A. Hervey, R.W. Davidson, R. Ma and W.C. Robbins: A survey of some wood-destroying and other fungi for antibacterial activity.
Bull. Torrey Bot. Club 72, 165 - 190 (1945)

Schönbeck, F.: ÜberBildung und Wirkung antibiotischer Stoffe aus einem Botrytis cinerea-Stamm.
Phytopath. Z. 63, 193 - 195 (1968)

Sunthankar, S.V. and Ch.R.J. Dawson: The structural identification of the olefinic components of Japanese lac urushiol.
J. Am. Chem. Soc. 76, 5070 - 5074 (1954)

Symes, W.F. and Ch.R. Dawson: Poison ivy "urushiol".
J. Am. Chem. Soc. 76, 2959 - 2963 (1954)

Vogel, H.J. and D.M. Bonner: Acetylornithinase of E. coli: Partial purification and some properties.
J. Biol. Chem. 218, 97 - 106 (1956)

Walser, J. and P.F. Heinstein: Mode of actior of illudin S.
Antimicrob. Ag. Chemother. 3, 357 - 363 (1973)

Weitzel, G., F. Schneider, A.M. Fretzdorff, J. Durst und W.D. Hirschmann: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. II.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 433 - 442 (1967)

Wilkins, W.H.: Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the sixth 100 species more Basidiomycetes of the wood-destroying type.
Brit. J. Exp. Path. 28, 53 - 56 (1947 a)

--- Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the seventh 100 species,all Basidiomycetes.
Brit. J. Exp. Path. 28, 247 - 252 (1947 b)

--- Investigation into the production of antibacterial substances by fungi. Preliminary examination of the eighth 100 species,all Basidiomycetes.
Brit. J. Exp. Path. 28, 416 - 417 (1947 c)

--- Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the ninth 100 species, all Basidiomycetes.
Brit. J. Exp. Path. 29, 364 - 364 (1948)

Williams, D.H. und I. Fleming: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage (1975)

Zähner, H.: Biologie der Antibiotika.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1965)

--- Einige Aspekte der Antibiotika-Forschung.
Angew. Chem. 89, 696 - 703 (1977)

Lebenslauf

Am 23. Oktober 1949 wurde ich in Mönchengladbach (Odenkirchen) geboren.

Von 1956 bis 1961 besuchte ich die Volksschule. Im Juni 1969 legte ich am Städtischen Gymnasium Odenkirchen in Mönchengladbach die Reifeprüfung ab.

Nach zweijähriger Lehre als Apothekerpraktikant bestand ich im Juni 1971 in Düsseldorf die pharmazeutische Vorprüfung.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Universität Kiel mein Pharmaziestudium. Den ersten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung bestand ich am 18. Oktober 1973, den zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 19. Juni 1975.
Am 17. Juli 1975 wurde mir die Approbation als Apotheker erteilt.

Im November 1975 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Oberwinkler und unter Anleitung von Herrn Dr. T. Anke am Institut für Biologie I, Lehrbereich Spezielle Botanik, der Universität Tübingen mit der Durchführung dieser Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren:

F. Amelunxen, H. Franke, D. Frohne,
D. Goltz, R. Lincke, W. Loeffler,
H. Lüllmann, H. Martin, A. Mondon,
W. Müller-Ruchholtz, F. Neuwald,
F. Oberwinkler, W. Preetz, P. Pohl,
H. Scharnweber, J. Schnekenburger,
O.E. Schultz, K.W. Vietor, O. Wassermann, U. Welsch, H. Wolf, A. Ziegler